2196

T H E S E

p r é s e n t é e

à

L ' U N I V E R S I T E D E P A R I S X I

C E N T R E D ' O R S A Y

Pour obtenir le titre de Docteur 3ème Cycle

Spécialité : B I O C H I M I E

par

Nicole HAEFFNER

Sujet de la thèse : Etudes des relations qui existent entre la structure et les activités biologiques de la "fraction lipidique" de l'endotoxine de Bordetella pertussis.

Soutenue le : 25.11.76 devant la Commission d'examen

DAVID S. Président

PETIT J.F.
SELIGMAN M. Membres
SZABO L.

T H E S E

p r é s e n t é e

à

L ' U N I V E R S I T E D E P A R I S X I

C E N T R E D ' O R S A Y

Pour obtenir le titre de Docteur de 3ème Cycle

Spécialité : B I O C H I M I E

par

Nicole HAEFFNER

Sujet de la thèse : Etudes des relations qui existent entre la structure et les activités biologiques de la "fraction lipidique" de l'endotoxine de Bordetella pertussis.

Soutenue le

devant la Commission d'examen

DAVID S. Président
PETIT J.F.
SELIGMAN M. Membres
SZABO L.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Biochimie de l'Université d'Orsay (Paris XI).

Avant de commencer l'exposé de cette thèse, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Ladislas SZABO, Directeur de Recherche au C.N.R.S., qui m'a accueillie avec bienveillance dans son laboratoire et qui, par sa grande expérience et ses critiques m'a appris à discerner les vrais problèmes tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Richard CHABY qui m'a guidé tout au long de ce travail. Sa compétence et son amitié ont largement contribué à sa réalisation.

Je remercie Monsieur Gérard AYME et son équipe de l'Institut Mérieux pour la réalisation des tests biologiques.

Mes remerciements vont également à tous mes camarades de laboratoire dont l'attitude très amicale a toujours facilité mes conditions de travail.

Enfin, je remercie Mademoiselle Marie-Hélène SARDA qui a effectué avec beaucoup d'amabilité la dactylographie de cette thèse.

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION

METHODES D'ANALYSE :

1 - Méthodes de dosages.
2 - Obtention dde l'endotoxine de Bordetella pertussis.
3 - Chromatographies.
4 - Etudes des acides aminés.
5 - Electrophorèses.

Chapitre I : ISOLEMENT DU LIPIDE

1 - Préparation du glycolipide.
2 - Cinétique de la liaison cétosidique du KDO-P
3 - Cinétique de libération des acides gras.
4 - Isolement du "Lipide".

Chapitre II : ESSAIS DE PURIFICATION DU "LIPIDE".

1 - Essai de purification par chromatographie sur Sphérosil.
2 - Fractionnement du "Lipide".

a) purification du glycolipide.
b) purification du lipopolysaccharide.
c) obtention des différentes fractions lipidiques.

Chapitre III : ETUDES DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DU GLYCOLIPIDE (GLP-A).

1 - Pouvoir pyrogène et toxicité.

a) effet pyrogène.
b) le "Mouse-Weight-Gain-Test".
c) phénomène de Schwartzmann.

2 - Action sur l'immunité non spécifique.
3 - Pouvoir adjuvant.

Chapitre IV : ANALYSES GLOBALES DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DU GLYCOLOPIDE (GLP-A).

1 - Composition chimique des différentes fractions.
2 - Comparaisons des hydrolysats des lipides A2 et X2 par électrophorèse et par autoanalyseur d'acides aminés.

a) Comparaison par électrophorèse.
b) Analyses des acides aminés.
c) Action d'un traitement alcalin doux sur les lipides A2 et X2.

Chapitre V : ETUDES DES ACIDES GRAS DE L'ENDOTOXINE DE BORDETELLA PERTUSSIS ET DE SES FRACTIONS LIPIDIQUES.

1 - Etablissement d'un protocole pour l'analyse des acides gras.

a) Traitement alcalin doux
b) Hydroxylaminolyse
c) Traitement alcalin fort
d) Methanolyse
e) Hydrolyse acide forte
f) Protocole utilisé pour l'analyse des acides gras

2 - Etude des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

a) Comparaison des lipopolysaccharides de :

- B. pertussis, souche L 84 ϕIet IV
  souche 1414
- B. parapertussis NCTC 8250

b) Etude des acides gras présents dans les différentes fractions provenant du GLP-A.

3 - Nature des liaisons des acides gras dans l'endotoxine et ses fractions lipidiques.

Chapitre VI : ETUDES STRUCTURALES DES LIPIDES A.

1 - Relation entre la libération de glucosamine réductrices et la libération de phosphore inorganique du Lipide A.

2 - Traitement du lipide A par l'hydroxylamine

a) Action d'une oxydation périodique sur le lipide hydroxylaminolysé.

b) Détermination approximative du poids moléculaire du Lipide A hydroxylaminolysé (LIP-A-NH_2OH)

3 - Etude de la cinétique de libération de la glucosamine au cours d'une hydrolyse acide du Lipide A2

4 - Etudes des fragments du Lipide A2 formés par une hydrolyse acide (HClN 5 h, à 100°C)

a) Etude de l'hydrolysat par électrophorèse
b) Etude de l'hydrolysat après passage sur une résine (DOWEX G 50)

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548118_0031

ABREVATIONS ET CONVENTIONS EMPLOYEES

EMC ..... Virus de l'encephalomyocardite
GLN ..... Glucosamine
GLNP ..... Glucosamine-phosphate
GLP ..... Glycolipide
KDO Acide-2-céto-3désoxy-D-manno-octonique
LIP ..... Lipide
LIP-A-SA ..... Lipide obtenu à partir de Salmonelle
LIP-A-BP ..... Lipide obtenu à partir de Bordetella pertussis
LIP-A-NH_2OH ... Lipide hydroxylaminolysé
LPS ..... Lipopolysaccharide
N ..... Azote
P ..... Phosphore
PA ..... Pseudomanas aeruginosa
PS ..... Polysaccharide
ST ..... Salmonella typhi
SF ..... Virus "Semliki Forest"
3000 rpm..... 1500 g.

Les tâches hachurées représentées sur les chromatogrammes sont des substances de référence.

Les tâches dont le contour est tracé en pointillés sont celles qui se révèlent faiblement.

INTRODUCTION

L'enveloppe cellulaire des bactéries à gram négatif est constituée de couches (fig. 1) dont la composition chimique, les propriétés physiques et physiologiques sont très différentes (réf.13).

La membrane externe contient des protéines, des phospholipides et des quantités variables de lipopolysaccharide. Entre la membrane externe et la membrane interne, on trouve des complexes lipoprotéiques et le peptidoglycane dont l'association confère à l'enveloppe cellulaire sa rigidité. La membrane cytoplasmique, la plus interne, est l'interface où sont synthétisés et assemblés les éléments structuraux de la membrane externe.

Les macromolécules de la couche la plus externe, en contact avec l'hôte, sont les principaux responsables des activités biologiques et immunologiques engendrés par le germe entier.

Un certain nombre de ces activités est porté par une même macromolécule , appelée endotoxine qu'il est possible d'isoler du reste de l'enveloppe cellulaire par différentes techniques. La plus employée est celle au phénol-eau de O.WESTPHAL (réf.50). Cette endotoxine, constituée de sucres, d'une partie lipidique, et de quelques acides aminés, est désignée par le terme de lipopolysaccharide.

Les endotoxines font, depuis plus d'un demi-siècle, l'objet de recherches non seulement chimiques, mais encore biologiques, pharmacologiques et médicales.

Les endotoxines s'opposent dans leur action aux exotoxines, lesquelles diffusent hors des bactéries. Leur action immunitaire est complexe, puisqu'elles sont à la fois des antigènes, des adjuvants, des immunostimulants, des toxines neurotropes et des pyrogènes.

Les animaux supérieurs sont sensibles aux endotoxines à des doses de 0,001 à 0,01µg/kg, à forte dose, elles provoquent le phénomène de SCHWARTZMANN et la mort de l'animal.

On sait depuis longtemps, que l'injection de bactéries à gram négatif augmente la résistance de l'hôte vis-à-vis d'un grand nombre d'agents phathogènes (réf.51).

En 1935, BORDET (réf. 6) avait montré que l'association de Bordetella pertussis à l'anatoxine diphtérique augmente, après injection, le taux d'antitoxines dans le sérum. Cette activité adjuvante a été attribuée à l'endotoxine de B. pertussis.

Les endotoxines présentent de nombreuses autres activités : elles augmentent la production d'interféron , provoquent l'activation des macrophages qui est associée à la production d'interféron . Elles sont un activateur de la voie alterne du complément (réf. 4). In vitro, elles provoquent la transformation blastique, ce sont des mitogènes des cellules B, murines ; elles réagissent avec le complément et provoquent la perte de son activité hémolytique, cette activité anticomplémentaire a été attribuée à la partie lipidique de l'endotoxine (réf.21). Cette dernière appelée Lipid-A dans le cas des Entérobactéries serait la partie de la molécule lipopolysaccharidique responsable des activités endotoxiques (réf. 12,21, 26, 28, 51)

Le Lipid-A s'avère également immunogène. Les anticorps dirigés contre lui sont très spécifiques, ils appartiennent à la fois aux classes IgM et IgG (réf.22).

Depuis des années, un nombre relativement restreint d'auteurs ont cherché à isoler les endotoxines et à déterminer leur structure.

Ce sont surtout les lipopolysaccharides des Entérobactériaceae qui ont été le plus analysés. En particulier dans cette famille, les Salmonelleae et les Escherichieae ont été très étudiées.

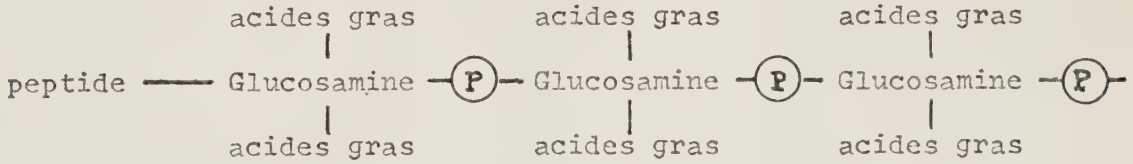
O. LUDERITZ et al. (réf 32) proposent que le lipopolysaccharide des Salmonelles est constitué de trois régions (fig. 2). Une région lipidique : le Lipid-A, une région polysaccharidique commune à toutes les Salmonelles appelée Core, et une autre également polysaccharidique variable selon les groupes sériques, constituée d'unités répétitives d'oligosaccharides. Le Lipid-A étant lié au Core par un trisaccharide d'acide-2-céto-3-désoxyoctonique (KDO) (réf.15).

De nombreuses techniques ont été utilisées par différents auteurs pour libérer le Lipid-A du reste de la macromolécule : toutes font appel à une hydrolyse acide douce (tableau I).

La proportion de Lipid-A ainsi obtenue, à partir de souches sauvages de différentes bactéries à gram négatif, est très variable. Elle peut varier de 1 % chez Brucella melitensis à 30 % chez Pseudomonas aeruginosa (tableau I).

Lorsque l'on effectue une hydrolyse acide forte du Lipid-A, on trouve essentiellement : de la glucosamine, du phosphate, des acides gras et une faible proportion d'acides aminés. (tableau I).

En 1961, NOWOTNY a proposé (réf. 36) la structure suivante pour le Lipid-A de Salmonella abortus equi :



Ce modèle serait un enchaînement de glucosamines-phosphorylées sur lesquelles sont liés les acides gras ; ce squelette de glucosamine-phosphate serait lié à un peptide.

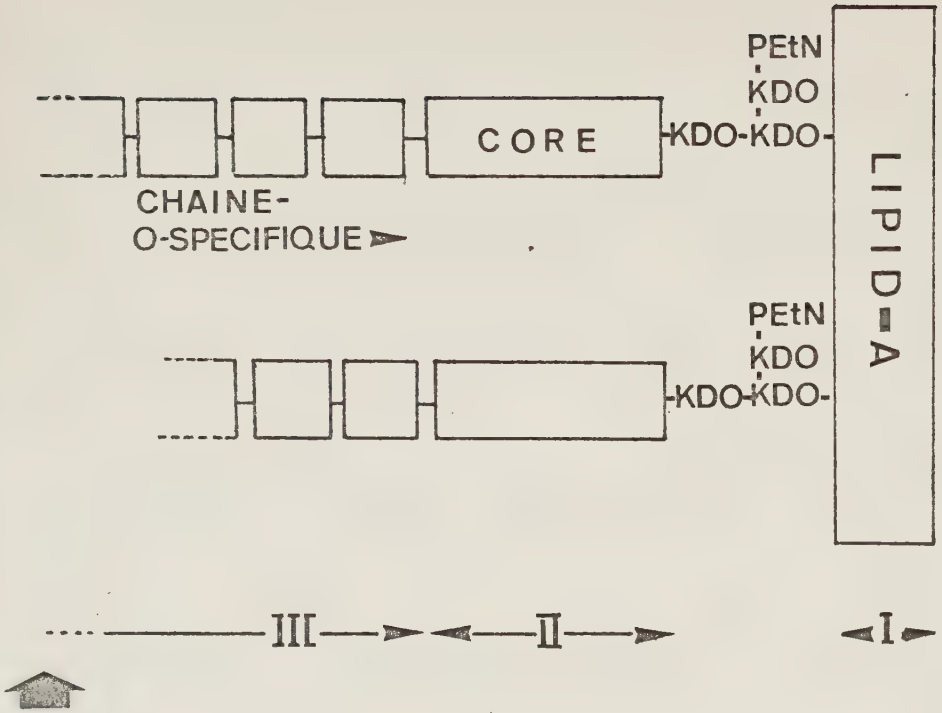


figure 2 : Structure schématique du lipopolysaccharide (LPS) de Salmonelle

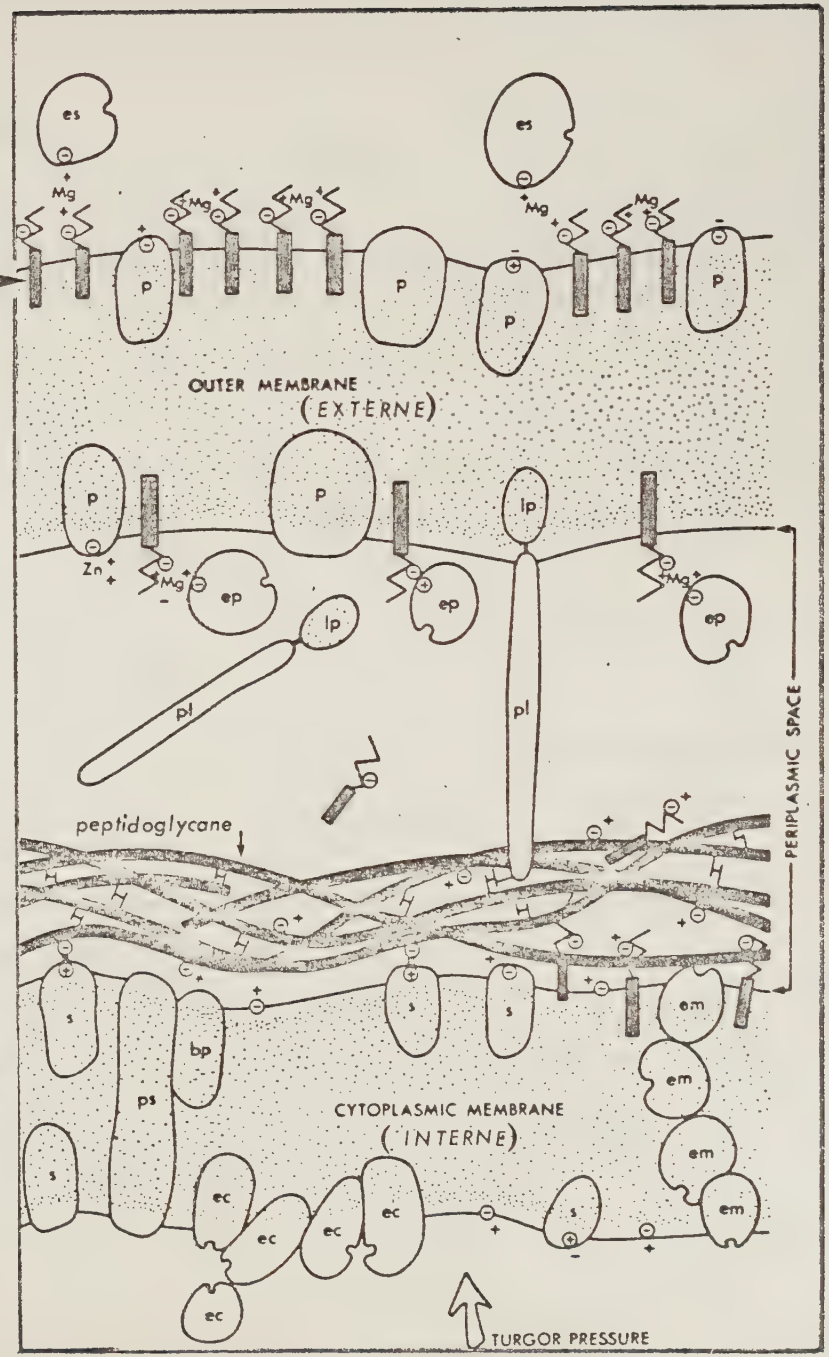


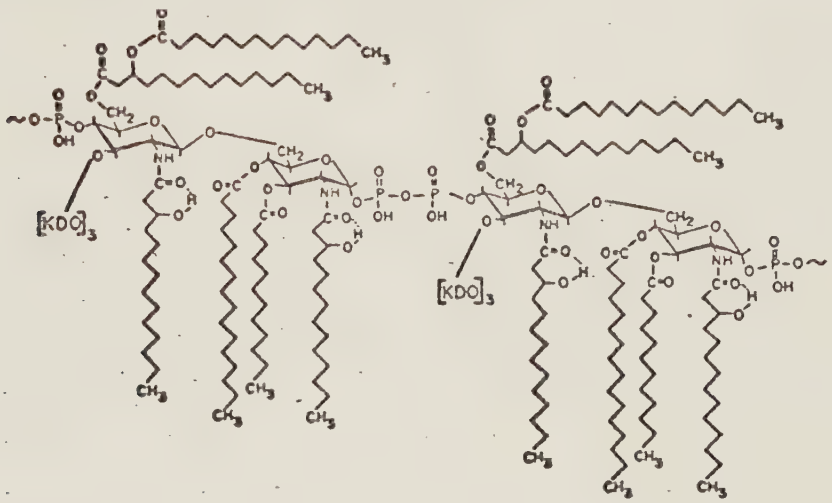
figure 1: Structure schématique de la membrane des bactéries à Gram négatif.

	Méthodes d'obtention du Lipid-A	% de Lipid-A par rapport au LPS	constituants du Lipid-A				Références
			% d'hexosamine	% de phosphore	% d'acides gras	% d'acides aminés	
Escherichia coli	HCl 0,1N, 30 min à 100°C	14	16-20	1,9	63		7-1
Eberthella typhi	H_2SO_4 0,125N, 2h à 100°C	15	12,84	2,16	60-65	6	14
Shigella flexneri	H_2SO_4 0,125N, 2h à 100°C	14,8	10,8	1,08	52		1
Serratia marcescens	H_2SO_4 0,25N, 2,5h à 100°C	22,7	9,6-13,4	1,5-1,9	58,2-69,8	2	2
Pseudomonas aeruginosa	H_2SO_4 0,5N, 30min à 100°C	23-33	15,9	3,2	52	+	19
Brucella melitensis	CH_3COOH 0,1N, 1h à 100°C	1	+	+	+	traces	29

TABLEAU I

Toutefois, une contamination protéique du Lipid-A lors de l'extraction de l'endotoxine pouvait expliquer la présence d'une partie au moins des acides aminés rencontrés dans cette fraction.

En 1973, une structure du Lipid-A des Salmonelles a été présentée par O. LUDERITZ et al. (réf. 23, 32) où l'existence de la protéine n'est plus mentionnée :



S. HASE et Th. RIETSCHEL (réf. 25) généralisent cette structure à la plupart des Entérobactéries.

Le squelette du Lipid-A serait constitué d'un enchaînement de disaccharides de glucosaminyl-β1-6-glucosamine reliés par des ponts pyrophosphates, les acides gras étant liés aux glucosamines par des liaisons esters ou amides.

Comme nous venons de le voir, la composition chimique et les activités biologiques des bactéries à gram négatif ont surtout été étudiées chez les Entérobactériaceae. L'équipe, au sein de laquelle j'ai effectué mon travail, étudie l'endotoxine de Bordetella pertussis. Si ce microorganisme est une bactérie à gram négatif, il n'est pas une Entérobactérie, il appartient à la famille des Brucellaceae.

Il a déjà été montré (8) par notre équipe que le schéma généralement admis pour la structure du lipopolysaccharide des Entérobactéries, n'est pas applicable à l'endotoxine de B.pertussis. En effet, cette dernière est constituée de deux chaînes polysaccharidiques différentes, non reliées entre elles et d'une fraction lipidique.

Le travail exposé dans cette thèse consiste à étudier la structure et les activités biologiques de la fraction lipidique de l'endotoxine de B.pertussis afin de tenter de répondre à deux questions que nous jugions importantes :

- la première était de savoir si les propriétés biologiques de l'endotoxine, généralement attribuées à la seule macromolécule du Lipid-A, étaient portées par une seule entité, ou bien si le Lipid-A avait plusieurs sites distincts, chacun des sites stimulant une ou plusieurs activités biologiques.

S'il n'existe qu'un seul site sur la macromolécule lipidique, toutes les activités biologiques seraient dues à une succession de mécanismes déclanchés par l'interaction entre le site unique et le système effecteur de l'organisme. Dans ce cas, une modification du Lipid-A devrait perturber toutes les activités, voire même les annuler.

Par contre, s'il existe plusieurs sites, agissant chacun sur un système particulier et déclanchant une ou un certain nombre d'activités, il était important de savoir s'il était possible de séparer, par un traitement physique ou chimique approprié, ces différents sites, en leur conservant leur potentialité d'induire l'effet biologique qui leur est spécifique.

- la deuxième question était de savoir si le "Lipid-A" de B. pertussis avait une structure analogue au modèle présenté par O. LUDERITZ pour les Entérobactéries, afin de savoir si ce modèle pouvait être étendu à d'autres bactéries à gram négatif, ou bien, si le Lipid-A est spécifique de chaque famille bactérienne. On sait en effet, que les endotoxines, et plus particulièrement leur fraction lipidique, ont en commun un certain nombre d'activités biologiques. Il était donc important de savoir dans quelle mesure des différences de structure pouvaient affecter ou non, ces activités.

METHODES D'ANALYSES

1 - METHODES DE DOSAGES

A) Dosage des sucres totaux :

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de DUBOIS et coll. (16). Elle permet un dosage rapide, et donne des résultats reproductibles à condition de ne pas employer des volumes trop faibles. Les sucres sont détruits par l'acide sulfurique pour donner des dérivés de type furfural qui fournissent avec le phénol des colorants ayant un maximum d'absorption à 490 nm si le sucre dosé est un hexose, et à 480 nm s'il s'agit de pentoses ou d'acides uroniques. L'inconvénient de la méthode est que le coefficient d'absorption molaire des différents oses n'est pas le même, de sorte que lorsqu'on est en présence de plusieurs glucides, la valeur obtenue ne représente pas la teneur réelle en sucres. On l'exprime alors en "valeur" de glucose, heptose, etc...

B) Dosage du phosphore :

Nous avons employé la méthode colorimétrique de CHEN et al. (10) car étant très sensible, elle permet de doser même 1 µg de phosphore.

C) Dosage des hexosamines :

Pour être dosées, les hexosamines doivent être libres. Dans notre cas, une hydrolyse de 6 heures à 100°C par l'acide chlorhydrique (4N) permet d'obtenir la valeur maximale. On utilise la méthode de ELSON-MORGAN modifiée par RONDLE et MORGAN (39), avec la glucosamine comme référence, après élimination de l'acide chlorhydrique par évaporation sous vide en présence de potasse.

D) Dosage des acides gras :

Il se fait selon SNYDER et STEPHENS (43). Après une hydrolyse par l'acide chlorydrique 4 N à 100°C, pendant 2h, les acides gras libérés sont extraits par du chlorure de méthylène, puis traités par du diazométhane.

L'hydroxylamine transforme alors les esters en hydroxamates qui, en présence de perchlorate ferrique, donnent un colorant pourpre ayant un maximum d'absorption à 530 nm. Nous avons utilisé l'acide β-hydroxymyristique comme référence.

E) Dosage de l'acide 2-céto-3-désoxy-octonique (KDO) :

WEISSBACH et HURWITZ (49) ont montré que l'acide β-formyl pyruvique formé au cours du traitement du KDO (non substitué) par le périodate, peut être condensé avec l'acide 2-thiobarbiturique pour donner un colorant rouge ayant un maximum d'absorption à 550 nm. Ils ont pensé qu'il fallait qu'il soit libre en position 4 et 5, pour que le KDO puisse, après traitement par le périodate, donner de l'acide β- formyl-pyruvique.

Cependant CHARON a montré, que si le KDO était substitué en position 5, il réagissait dans le test à l'acide 2-thiobarbiturique, mais 7 fois moins que le KDO non substitué ; de même s'il est substitué en 4, il possède un coefficient d'extinction molaire 30 fois plus faible. (9)

Au cours du dosage du KDO présent dans le lipopolysaccharide, il a été observé que l'on n'obtenait pas le spectre, caractéristique du KDO. Ceci était probablement dû à une interférence des désoxysucres qui, clivés par le périodate donnent du malonaldéhyde. Celui-ci se condensant avec le thiobarbiturate donne un colorant absorbant à 532 nm.

Il a été mis au point dans l'équipe une formule permettant de calculer le pourcentage de KDO qui annule cette interférence:

$$\% \text{ KDO} = \frac{(2 \times \text{absorbance}_{550\ nm} - \text{absorbance}_{532\ nm}) \times 0{,}435}{\text{mg de lipopolysaccharides}}$$

C'est cette formule que nous avons utilisée.

F) Dosage de l'azote :

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de G.R. MORISSON (35), avec la glucosamine comme référence.

G) Dosage des sucres réducteurs :

Ce dosage a été effectué selon la méthode de M. SOMOGYI (réf. 44). Nous avons également utilisé la glucosamine comme référence.

H) Préparation de la solution d'hydroxylamine pour les hydroxylaminolyses:

0,4g de chlorydrate d'hydroxylamine sont dissous dans 0,5ml d'eau et on complète à un volume final de 10 ml avec de l'éthanol. 0,4g de soude sont dissous dans 0,5 ml d'eau et ce volume est complété à 10 ml par de l'éthanol.

Les deux solutions sont mélangées, et le précipité de NaCl obtenu est éliminé par centrifugation. Cette solution est alors utilisée directement pour les hydroxylaminolyses.

2 - OBTENTION DE L'ENDOTOXINE DE B. pertussis

La culture des germes de B. pertussis, ainsi que l'extraction de l'endotoxine ont été effectuées à l'Institut MERIEUX (Marcy-l'Etoile, Lyon). L'endotoxine est extraite selon la méthode de WESTPHAL (50).

L'extrait est ensuite dialysé contre de l'eau désionisée jusqu'à l'élimination du phénol. Le rétentat est concentré puis centrifugé à 150 000 g pendant 2h afin d'éliminer les acides nucléiques. Le culot est lavé jusqu'à élimination totale des acides nucléiques. Puis le culot est lyophilisé. On obtient donc à partir de 8,33 litres d'extrait phénolique, 5,5g de lipopolysaccharide.

3 - CHROMATOGRAPHIES

a) pour les chromatographies sur papier, nous avons utilisé du papier Whatmann n°1.

Solvants (ml)	A.	méthyl-éthyl-cétone	40 ml
		acide formique	20 ml
		méthanol	20 ml
		eau	15 ml
	B.	amoniaque	3 ml
		acide butyrique	50 ml
		eau	27 ml

Révélations : réactif à la ninhydrine-collidine
réactif au nitrate d'argent de Trevelyan (48)

b) Chromatographie sur plaque de silice :

- plaques de silice (Silice H MERCK) déposée en couche de 0,3 mm sur des plaques de verre.
- plaques de silice DC Fertigfolien (F 100 LS 254)

- solvants : A. chloroforme 47 ml
  méthanol 5 ml

  B. hexane 80 ml
  éther 20 ml

- révélation : à la vapeur d'iode.

c) Chromatographie sur gels :

- gel de silice sphérosil XOA 400
- gel de Biogel P 10 (100-200 mesh)
  P 30
- gel de Ultrogel AcA 44, volume 32 ml, éluant H_2O, débit 0,16 ml/mi
- gel de Biogel A 50 m (50-100 mesh),
  volume 50 ml, éluant H_2O, débit 0,08 ml/mi

d) Chromatographie en phase gazeuse :

Les chromatographies ont été effectuées à l'aide d'un appareil Aerograph 2700 (Varian) directement couplé à un spectromètre de masse DU PONT 21-492 B. Nous avons utilisé une colonne SE 30 à 3 % sur Varaport 30, de 1,5 m de long et de 3,2 mm de diamètre. La colonne est balayée à 25 ml/min par de l'hélium. La programmation de la température était linéaire de 8° par minute de 100°C à 270°C.

4 - ETUDES DES ACIDES AMINES

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un autoanalyseur Beckmann. Cet autoanalyseur est directement couplé à un intégrateur permettant, à l'aide de références Beckmann, d'obtenir la quantité de nano-moles de chaque acide aminé contenu dans l'échantillon analysé.

5 - ELECTROPHORESES

Les électrophorèses ont été effectuées à l'aide d'un appareil sur plaques horizontales (Savant Instrument).
Le papier que nous avons employé était d'une longueur de 90 cm (papier Whatmann n°3). Le champ utilisé de 4000 V/90 cm.

Tampons d' électrophorèses :

A.	pH = 1,9	(0,6 M)	acide formique	250 ml
			acide acétique	870 ml
			eau	8,88 l
B.	pH = 6,5	(0,06 M)	pyridine	1 l
			acide acétique	40 ml
			eau	8,96 l
C.	pH = 7,2	(0,2 M)	N-méthyl-morpholine	20 ml
			acide acétique	7,6 ml
			eau	972,4 ml

Révélations :

- réactif à la ninhydrine-collidine pour les amines primaires.
- pour les composés réducteurs, nous avons utilisé le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN (48).

6 - RESINE

Nous avons utilisé une colonne de résine DOWEX G 50 (H+) de 22 cm de haut et de 0,8 cm de diamètre.

Chapitre I

ISOLEMENT DU LIPIDE

Le lipopolysaccharide des Salmonelles est composé du "Lipid-A" et d'un polyoside à haut poids moléculaire. A.M.STAUB et O. WESTPHAL ont montré que ces polyosides comprennent une partie centrale commune à toutes les Salmonelles, généralement appelée "core", et une partie spécifique, propre à chaque sérotype et constituée par la répétition d'unités oligosidiques plus ou moins complexes (45).

On connaît des mutants (appelés R) qui ont perdu la partie polysaccharide du lipopolysaccharide, permettant ainsi d'isoler facilement le "Lipid - A" sans en altérer les activités endotoxiques par des hydrolyses qui auraient servi à son isolement. Si de tels mutants sont connus chez les Salmonelles, chez E.coli et chez Shigella flexneri, chez B.pertussis, nous ne connaissons pas de tels mutants, c'est pourquoi, il a fallu mettre au point une méthode d'obtention du "Lipide" à partir de l'endotoxine intacte ainsi qu'une méthode de purification.

On sait (33) que l'endotoxine de B.pertussis, tout comme celle des Entérobactéries contient des glucides et des lipides ; du point de vue chimique, elle est donc un lipopolysaccharide.

Les procédés d'hydrolyse utilisés par divers auteurs pour séparer le lipide et la partie glycosidique des endotoxines sont très différents. Ainsi, G.ADAMS (2), voulant isoler le "Lipide" de Serratia marscensens, a fait une hydrolyse du lipopolysaccharide à l'aide d'acide sulfurique (0,25 N) pendant 150 minutes à 100°C. Il obtint un précépité qu'il fractionna ensuite par chromatographie sur gel de silice. O.CREACH (14) suit une autre méthode : il hydrolyse le lipopolysaccharide d'Eberthella typhi par de l'acide chlorhydrique (2 N) pendant 30 minutes à 100°C et isole le précipité formé, soluble dans le chloroforme, qu'il nomme Lipide A, avec un faible rendement (15 %).

D'autres auteurs ont encore utilisé de l'acide formique (0,1 N) de l'acide acétique (1 N), etc..., sans que l'on puisse déterminer les raisons de leur choix.

Il est difficile de concevoir que des méthodes si différentes puissent donner des produits identiques même si, et cela n'est pas prouvé, la structure du Lipid-A de toutes les endotoxines des bactéries à gram négatif était identique.

R. CHABY (8) a montré que le lipopolysaccharide de B. pertussis était constitué d'un "lipide" et de deux chaînes polysaccharidiques PS.1 et PS.2. Le polysaccharide PS.2 se termine par un acide 2-céto-3 désoxy-octonique (KDO) qui est substitué en position 5 par de l'éthanolamine pyrophosphate, alors que le polysaccharide PS.1 a en position terminale, un KDO non phosphorylé. Le polysaccharide PS.2 est relié au "lipide" par l'intermédiaire du KDO.

M. LAPORTE (30) a montré que le polysaccharide PS.1 est également rattaché à la partie lipidique de l'endotoxine.

1 - Préparation du Glycolipide

A. LEDUR (31) a montré que, par une hydrolyse acide très douce (acide trifluoracétique pH 2,4), on pouvait séparer le lipopolysaccharide en deux fractions : l'une, le glycolipide est insoluble dans l'eau, représente le polysaccharide PS.2 encore lié au lipide, l'autre, soluble, est le polysaccharide PS.1 (fig.3).

Donc, pour obtenir le lipide, il suffirait de cliver sélectivement la liaison ulosidique de ce Glycolipide isolé (fig. 4).

A. LEDUR, travaillant sur le PS.1 a effectué sur quatre lipopolysaccharides (LPS 20, LPS 30, LPS 31, LPS 33) une hydrolyse par l'acide trifluoracétique (pH 2,4 à 50°C pendant 90 h) permettant d'obtenir quatre"Glycolipides" (GLP 20, GLP 30, GLP 31, GLP 33).

Quelques résultats d'analyse concernant ces différents "Glycolipides" sont donnés dans le tableau II. Nous voyons que le GLP 20 a une teneur en KDO très faible et serait donc peu contaminé par le PS.1 résiduel. De plus, sa faible teneur en sucres neutres et sa forte teneur en acides gras confirment que c'est cet échantillon qui représente la meilleure matière de départ. C'est pourquoi, nous avons choisi ce "Glycolipide" GLP 20 pour la suite de ce travail.

Une analyse plus détaillée de ce "Glycolipide" a donné les résultats suivants :

- 7,9 % de sucres neutres
- 0,035 % de KDO
- 2,3 % de phsophore
- 19,7 % de glucosamine
- 5,2 % d'heptose
- 37,9 % d'acides gras.

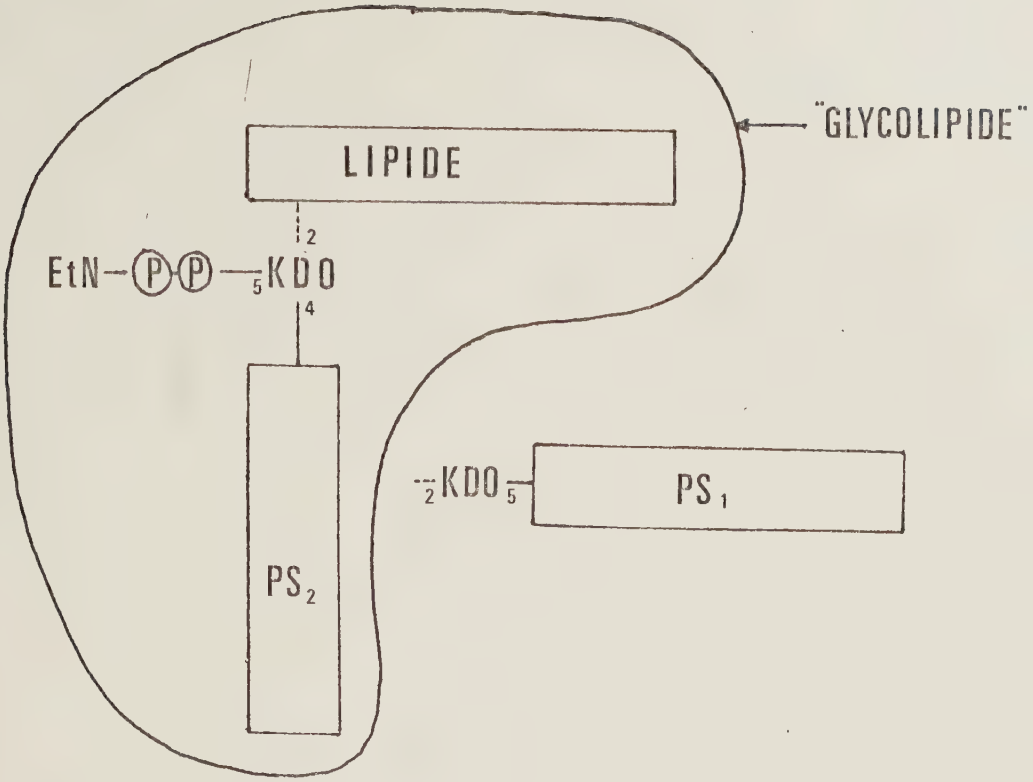


figure 3

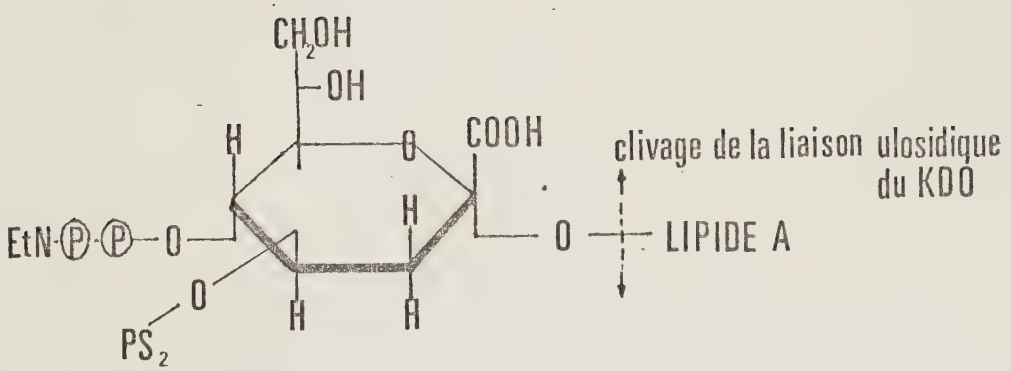


figure 4

	GLP 20	GLP 30 ①	GLP 30 ②	GLP 31	GLP 33
% en KDO	0,035	0,065	0,06	0,08	0,06
% en acide gras	37,9	31,7	25,5	31,6	26,2
% en sucre	7,9	8,7	9,1	13	7,9

Tableau II

2 - Cinétique d'hydrolyse de la liaison ulosidique du KDO phosphorylé.

Pour transformer le "Glycolipide" de B. pertussis en "Lipide", il aurait été nécessaire d'établir des conditions d'hydrolyse dans lesquelles la liaison ulosidique du KDO phosphorylé, et celle-ci seulement, eût été clivée.

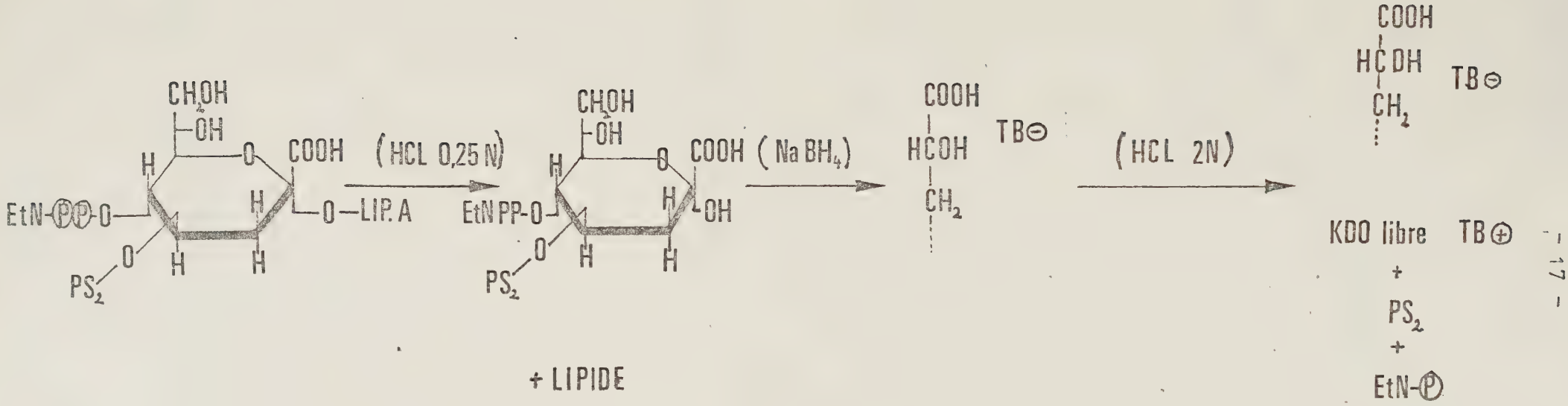
Cette condition, ne pouvant être satisfaite dans l'état actuel de nos connaissances, nous avons utilisé comme guide le maintien des liaisons ester des acides gras dont nous avons établi la présence dans le "Glycolipide". Pour définir de telles conditions nous avons suivi d'une part, la cinétique d'hydrolyse, dans l'acide chlorhydrique (0,25 N) à 100°C pendant une heure trente, de la liaison ulosidique du KDO phosphorylé, et d'autre part, la libération des acides gras.

Pour suivre la cinétique de clivage de la liaison osidique du KDO phosphorylé qui fait la liaison entre le "Lipide" et le PS.2, il fallait trouver des conditions de dosage de ce désoxyacide. En effet, comme nous l'avons dit plus haut, les acides 3-désoxy aldulosoniques ne sont pas dosables même si leur liaison osidique est libre, s'ils sont substitués en positions 4 et 5 ; or c'est précisément notre cas (9).

Nous avons donc dû recourir à un dosage indirect qui permet de doser le KDO résiduel non hydrolysé et de déterminer, par différence, le KDO dont la liaison ulosidique est coupée.

Pour ce faire, nous avons soumis des échantillons de GLP 20 à une hydrolyse par HCl 0,25 N à 100°C durant des temps variant de zéro à 1h30mn. Puis, ces échantillons ont été traités par $NaBH_4$: ce traitement transforme la fraction de KDO dont la liaison ulosidique est rompue par l'hydrolyse HCl 0,25 N en acide 3-désoxy octonique, un composé qui ne répond pas dans le test au thiobarbiturate. Ces mêmes échantillons ont été ensuite soumis à une hydrolyse forte (HCl 2N, 2h) qui clive non seulement la liaison ulosidique du KDO non hydrolysé auparavant, mais aussi la liaison probablement aminosidique du substituant en position 4 de ce même acide, le rendant ainsi dosable par le test au thiobarbiturate. La différérence faite entre la valeur mesurée pour le "glycolipide" ayant subi uniquement l'hydrolyse par HCl 2 N 2h à 100°C et les valeurs obtenues pour les différents échantillons ayant subi l'hydrolyse par HCl 0,25 N la réduction puis l'hydrolyse par HCL 2N 2h à 100°C, représente la fraction de KDO dont la liaison ulosidique a été clivée au cours de l'hydrolyse par HCl 0,25 N à 100°C.

Nous avons schématisé sur la figure 5 les différentes réactions et donné les résultats obtenus sur la figure 6a.



TB = thiobarbiturate.

figure 5

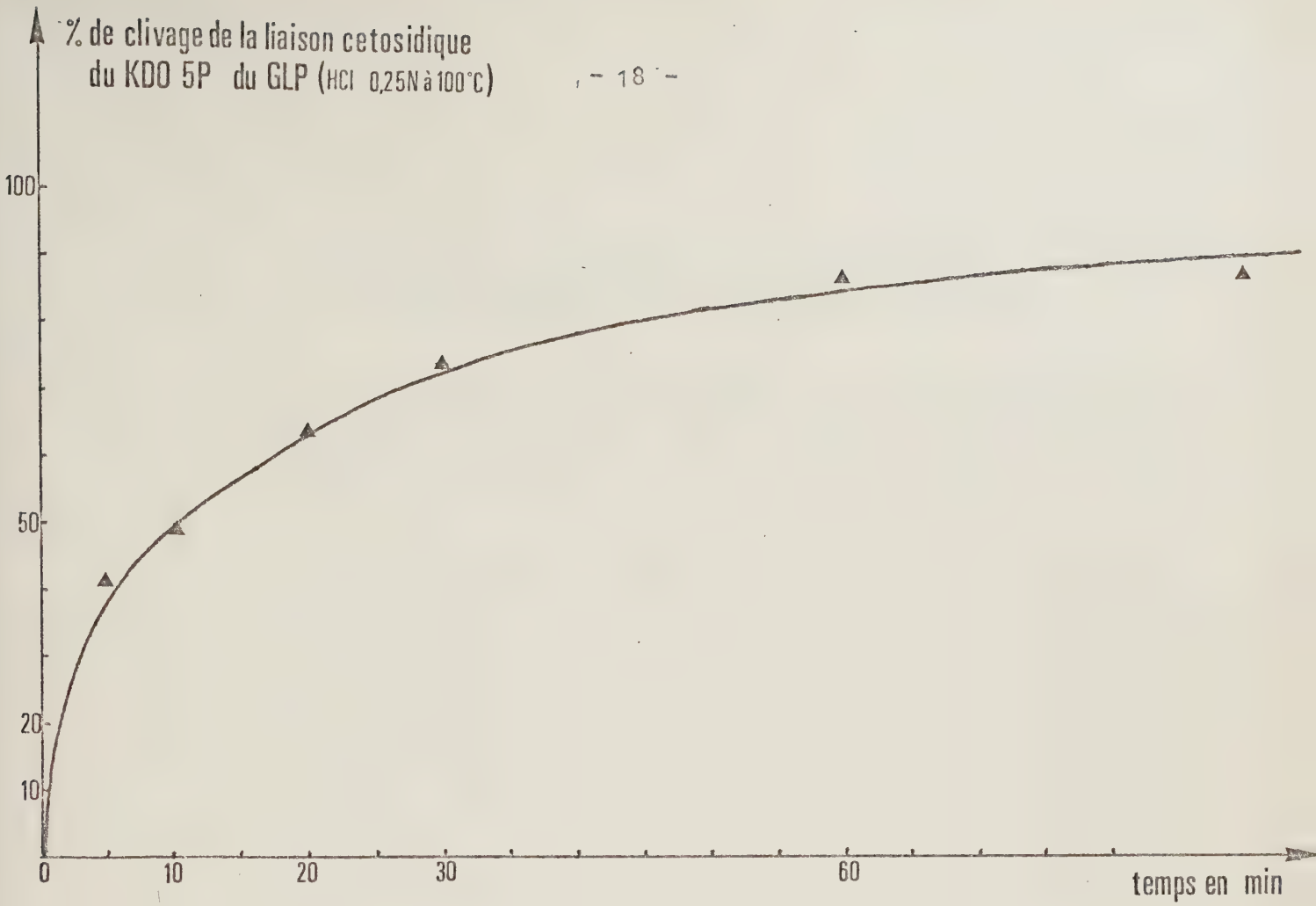


figure 6a

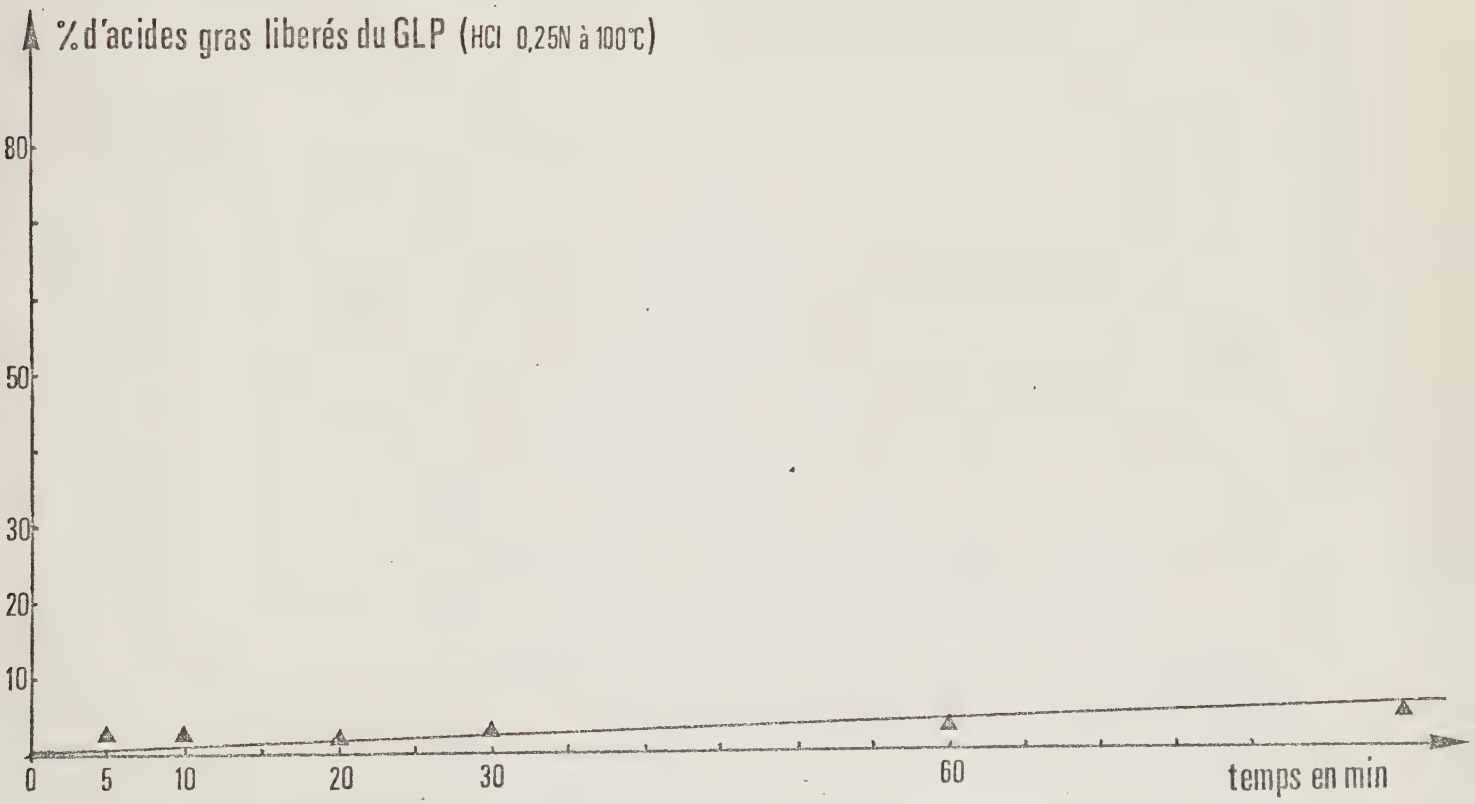


figure 6b

3 - Cinétique de libération des acides gras du "Glycolipide" au cours de l'hydrolyse par HCl 0,25 N à 100°C.

Nous avons dit plus haut que le critère arbitraire que nous avons choisi pour "mesurer" la dégradation ou la stabilité du "Lipide" dans les conditions d'hydrolyse utilisées pour le clivage de la liaison ulosidique du KDO phosphorylé, était l'hydrolyse des acides gras au cours de ce même traitement.

Afin de pouvoir mesurer cette hydrolyse, il nous fallait d'abord connaître la quantité totale d'acides gras présente dans le "Lipide". Nous avons déterminé celle-ci en soumettant le glycolipide à un traitement acide (HCl 4 N à 100°C, pendant 2 heures) qui transforme la totalité des esters et amides en acides libres ; ceux-ci ont été dosés, après extraction, par la méthode de STEPHENS (43). Par la suite, nous avons soumis des échantillons de "Glycolipide" au traitement acide prévu pour cliver la liaison ulosidique du KDO phosphorylé (HCl 0,25 N à 100°C), pendant des temps variant de 0 à 90 minutes. Pour tous les échantillons, nous avons dosé les acides gras libérés. Les résultats exprimés en pourcentage de la teneur totale donne une indication sur le degré de dégradation que subit le "Lipide" au cours de ce traitement (fig. 6 b).

En conclusion, les résultats de ces expériences nous montrent qu'entre 30 et 60 minutes d'hydrolyse, le pourcentage de clivage de la liaison osidique du KDO phosphorylé, a presque atteint son maximum et dans les mêmes temps, le pourcentage d'acides gras libérés passe de 2 à 3 %.

4 - Isolement du "Lipide".

Compte tenu des résultats précédents et sachant que le critère arbitraire que nous avons choisi pour mesurer la dégradation du "Lipide" au cours de son isolement n'est probablement pas suffisant, nous avons décidé, afin de libérer le "Lipide", d'effectuer une hydrolyse du "glycolipide" à l'aide d'HCl 0,25 N à 100°C pendant 3o mn seulement.
Nous savons cependant que dans ces conditions, nous ne clivons que 75 à 80 % de la liaison ulosidique.

Nous avons schématisé les différentes étapes d'isolement du "Lipide" sur la figure 7.

Nous sommes partis de 99,7 mg de glycolipide (GLP 20) et nous obtenons 22,55 + 15,65 mg de lipide soit 38, 3 %. Ce dernier est cependant contaminé par le "Glycolipide" non hydrolysé. Afin de connaître le degré de contamination, nous avons effectué un dosage du KDO sur les deux fractions : pour celle de 22,55 mg, nous trouvons 0,05 % de KDO et pour l'autre, (15,65 mg) 0,09 %.

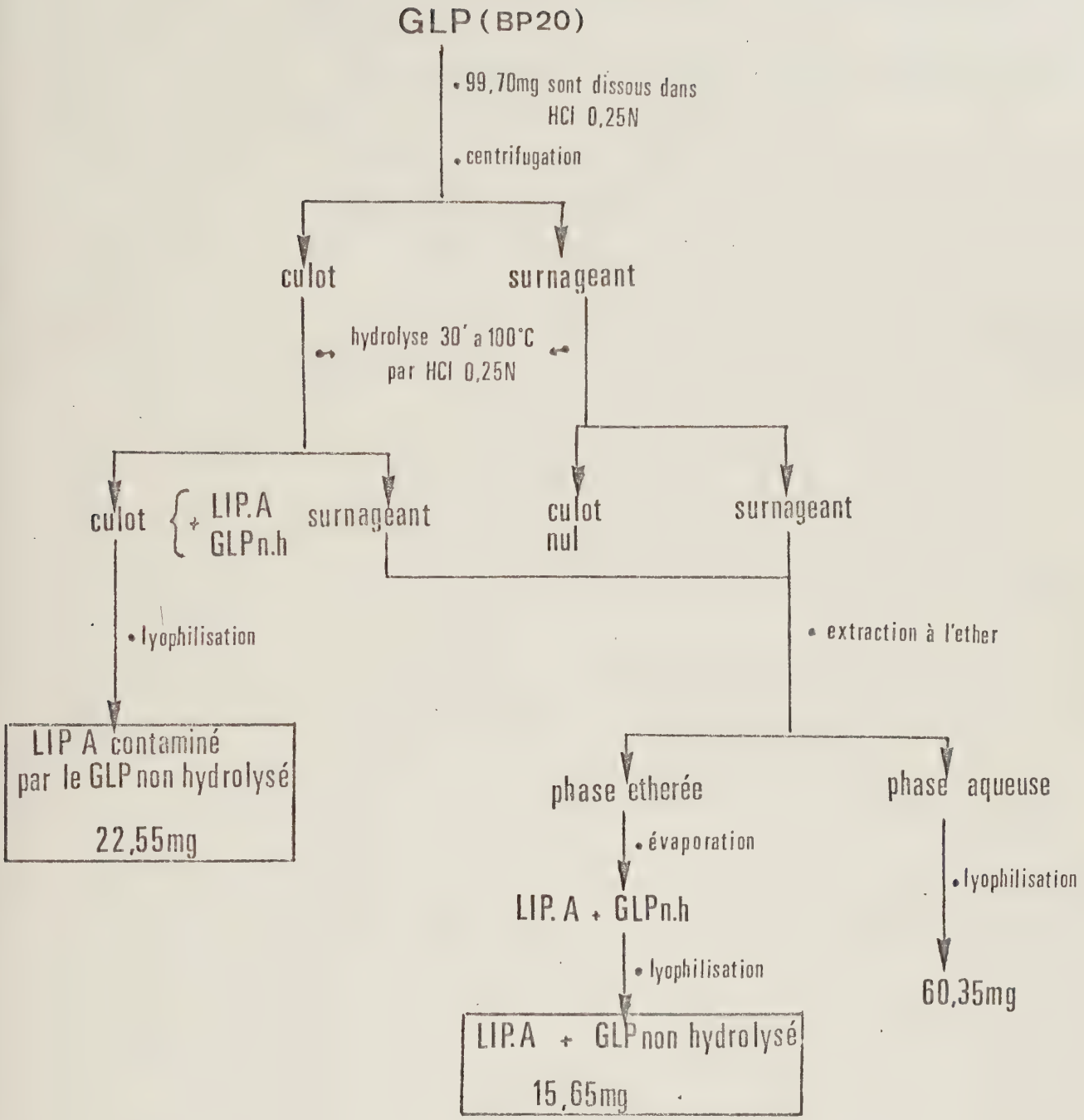


FIGURE 7: OBTENTION DE LA FRACTION LIPIDIQUE DE L'ENDOTOXINE A PARTIR DU GLYCOLIPIDE (GLP 20).

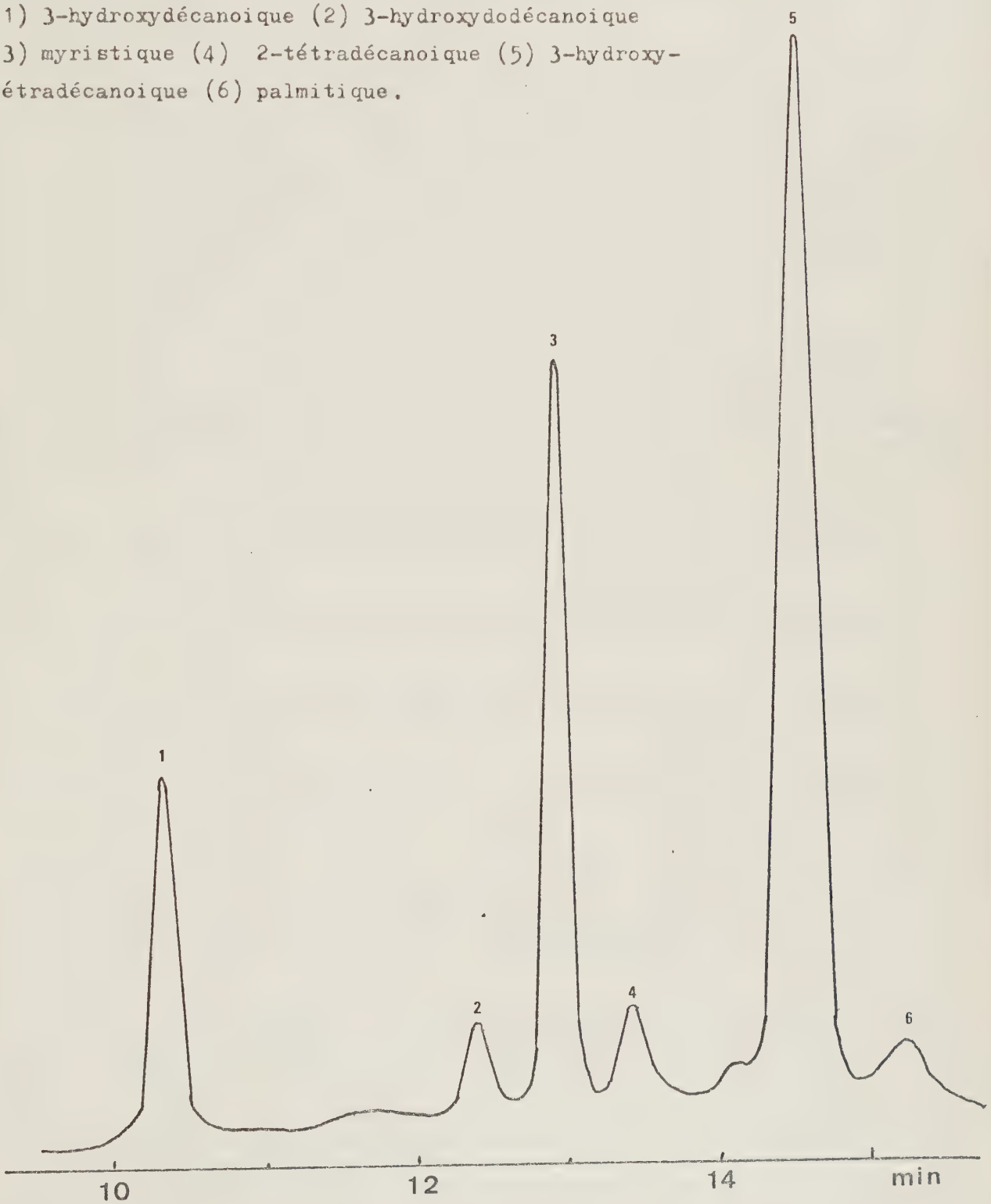
Sachant que dans les mêmes conditions, le "Glycolipide" de départ a un pourcentage de KDO de 0,311, nos deux fractions sont contaminées respectivement par 16,1 % et 29 % de "Glycolipide" non hydrolysé.

Une première analyse de ce "Lipide" donne les résultats suivants :

- 61,14 % d'acides gras,
- 1,86 % de phosphore,
- 14 % de glucosamine,
- 1,95 % d'azote,
- 3,1 % de sucres neutres.

Les esters méthyliques des acides gras du "Lipide" ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont donnés dans la figure 8.

Figure 8: Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du " lipide ". Les pics représentent les esters méthyliques des acides gras suivants: acide (1) 3-hydroxydécanoique (2) 3-hydroxydodécanoique (3) myristique (4) 2-tétradécanoique (5) 3-hydroxy-tétradécanoique (6) palmitique.



Chapitre II

ESSAIS DE PURIFICATION DU LIPIDE

Tous les auteurs sont d'accord pour dire que les Lipid-A sont des substances peu solubles. Aussi, pour les essais biologiques, on utilise souvent la "solubilisation" à l'aide de l'albumine du sérum de boeuf (51). C.GALANOS (24) a montré que le Lipid-A pouvait être dispersé en solution aqueuse au moyen de dextranes de faible poids moléculaires. Mais, il est évident que si l'on veut étudier la structure chimique du Lipide, ces méthodes ne sont pas utilisables ; il en est de même pour l'étude de certaines propriétés biologiques, car ces substances solubilisantes sont antigéniques (14).

Il nous fallait donc trouver un autre moyen de solubilisation du Lipide. Après de nombreuses recherches parmi les solvants classiques utilisés pour dissoudre les lipides, nous avons trouvé un mélange dans lequel nous arrivions à dissoudre en partie notre Lipide (mélange toluène-méthanol dans le rapport (1:1).

Nous avons alors cherché à purifier cette fraction soluble par chromatographie sur une colonne de silice (Sphérosil).

1 - Essai de purification par chromatographie sur Sphérosil

Nous avons chromatographié le lipide sur une colonne de Sphérosil de 10 cm x 0,78 cm2 (Sphérosil XO A 400 Ø 90 Å).

Sachant que le "lipide" contient 2,3 % de phosphore et que la méthode de dosage du phosphore permet d'en mesurer 1µg, nous avons utilisé ce dosage pour suivre l'élution du "lipide" à la sortie de la colonne. Un échantillon de 10 mg était dispersé dans 1 ml de mélange toluène-méthanol (1:1), et la suspension transformée en solution par traitement aux ultrasons. De la solution filtrée, un aliquot de 50µl est prélevé pour déterminer la quantité exacte de substances déposées sur la colonne : elle était entre 4,5 et 5 mg.

La colonne fut éluée par un mélange toluène-méthanol (1:1) et des fractions de 5 ml étaient récoltées dans lesquelles on dosait le phosphore après évaporation du solvant et minéralisation.

Dans une première expérience, le chromatogramme présentait un pic unique, mais ce pic ne comprenait pas la totalité de la substance déposée sur la colonne (fig. 9 a). Nous avons conclu que le passage sur le sphérosil n'était pas uniquement une chro-

matographie d'inclusion, et que nous avions simultanément une chromatographie d'adsorption.

Dans les expériences ultérieures, nous avons donc adjoint au solvant initialement choisi un éluant plus polaire : le méthanol et même l'acide formique. Les résultats d'une telle chromatographie sont représentés sur la figure 9 b. Apparemment, on obtient 3 pics majeurs dont un, le premier, représente 60 % de l'échantillon mis en oeuvre.

Nous avons cependant remarqué d'une part, que le pic majoritaire est exclu et d'autre part, qu'il sort au bout de 18 fractions (c'est-à-dire 90 ml) ; nous pouvons aussi constater que chaque fois que l'on change de solvant, le pic suivant sort également après 18 fractions. Ce fait nous a conduit à penser qu'il pouvait s'agir d'un artefact et que les pics apparemment inclus, n'apparaissaient en tant que pics homogènes, qu'en raison du changement brusque d'éluant.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc refait l'expérience utilisant cette fois-ci un gradient linéaire d'éluant toluène-méthanol-acide formique.

Le résultat obtenu est représenté sur la figure 9 c. On voit que si le pic exclu est toujours majoritaire (60 % du produit), les autres pics s'ordonnent dans un profil bien différent de ce que l'on a trouvé précédemment.

Arrivés à ce stade, nous pouvions penser que les 60 % du produit, exclus sur cette colonne, représentaient le lipide et que le reste (40 %) se répartissant en de nombreuses fractions, pouvait provenir d'une dégradation du Lipide qu'il aurait subie lors des différentes hydrolyses servant à le préparer.

Afin d'éliminer les éventuels fragments de Lipide qui se seraient formés au cours de la préparation du Glycolipide, nous avons décidé de purifier ce dernier en l'extrayant au toluène-méthanol. (1:1)

2 - Fractionnement du Lipide

a) Purification du Glycolipide :

Nous avons réunis les Glycolipides GLP 20, GLP 33, GLP 30 et 31. Nous disposions ainsi de 1,174 g de matériel.

Les 1,174 g de Glycolipide ont été suspendus dans 100 ml de mélange de toluène-méthanol (1:1) et l'ensemble séparé par filtration sur un verre fritté n°2. La fraction soluble dans le toluène-méthanol a été séchée et pesée. On recueille ainsi un extrait de 78,8 mg. Nous avons recommencé la même extraction quatre fois : nous avons recueilli successivement 44,7 ; 34,95 ; 22,75 et 16,3 mg d'extrait soluble dans le toluène-méthanol.

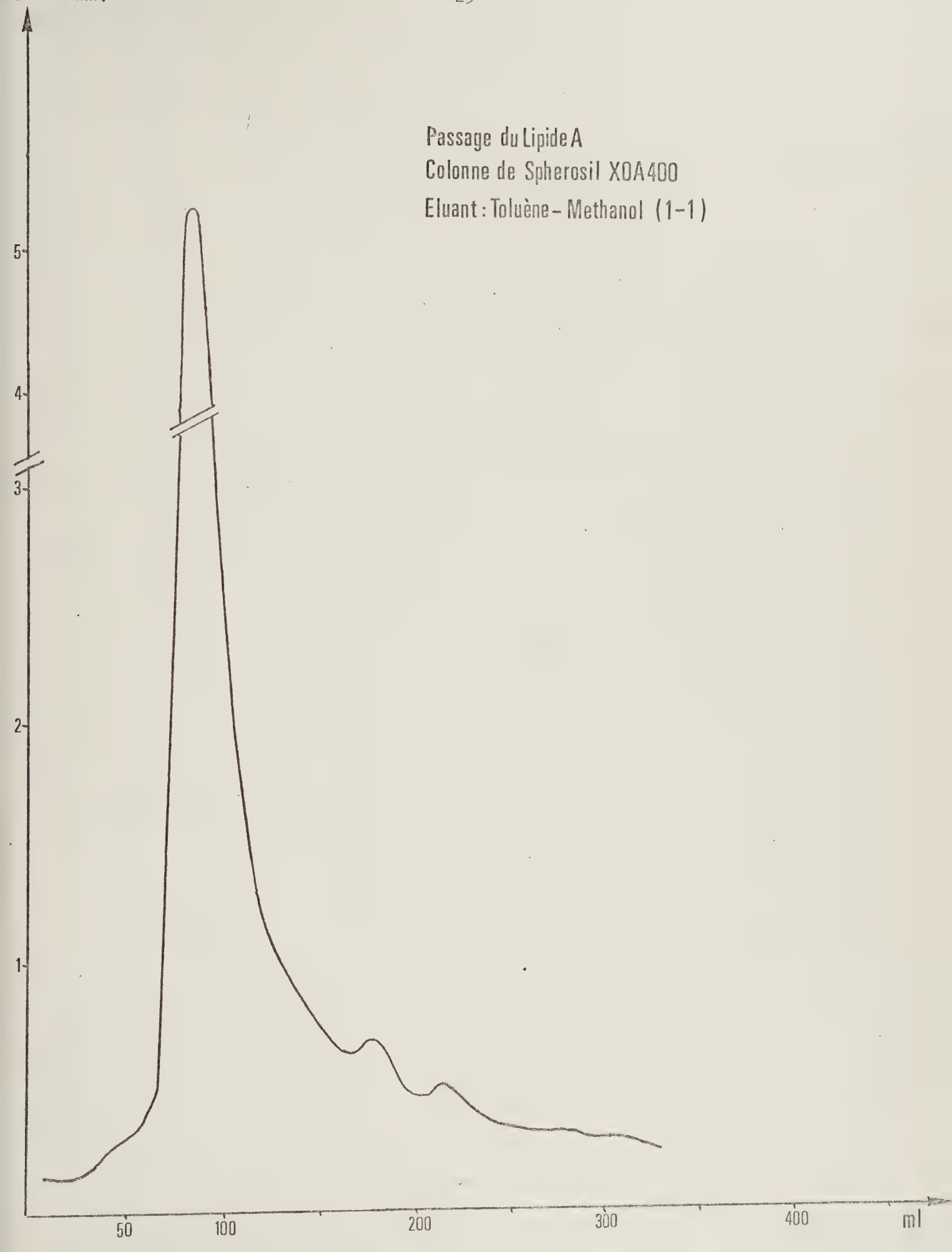

DO à 820 nm.
Passage du Lipide A
Colonne de Spherosil XOA400
Eluant : Toluène - Methanol (1-1)
5
4
3
2
1
50
100
200
300
400
ml

figure 9a

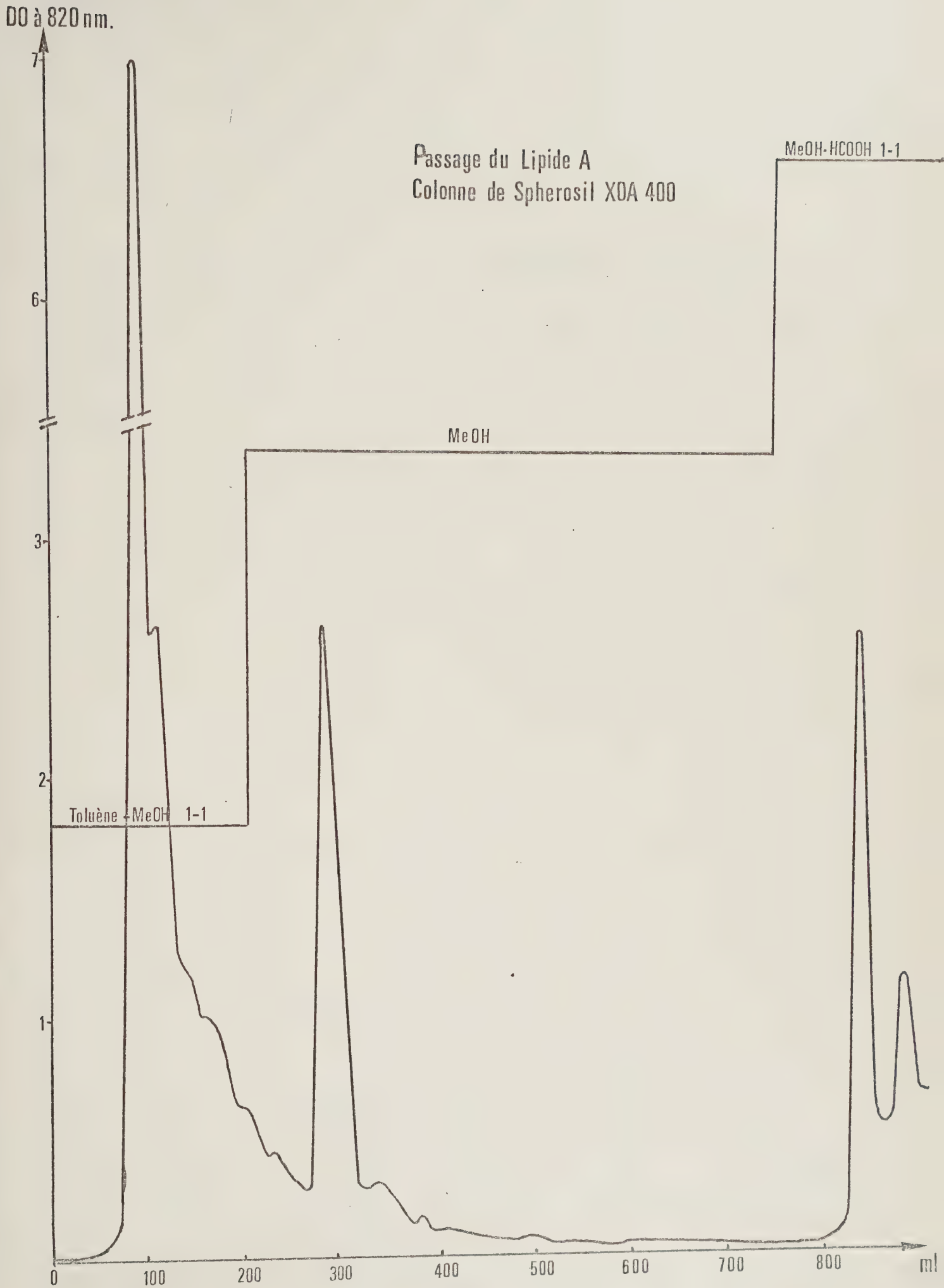

DO à 820 nm.
7
6
3
2
1
Passage du Lipide A
Colonne de Spherosil XOA 400
MeOH-HCOOH 1-1
MeOH
Toluène - MeOH 1-1
0
100
200
300
400
500
600
700
800
ml

figure 9b

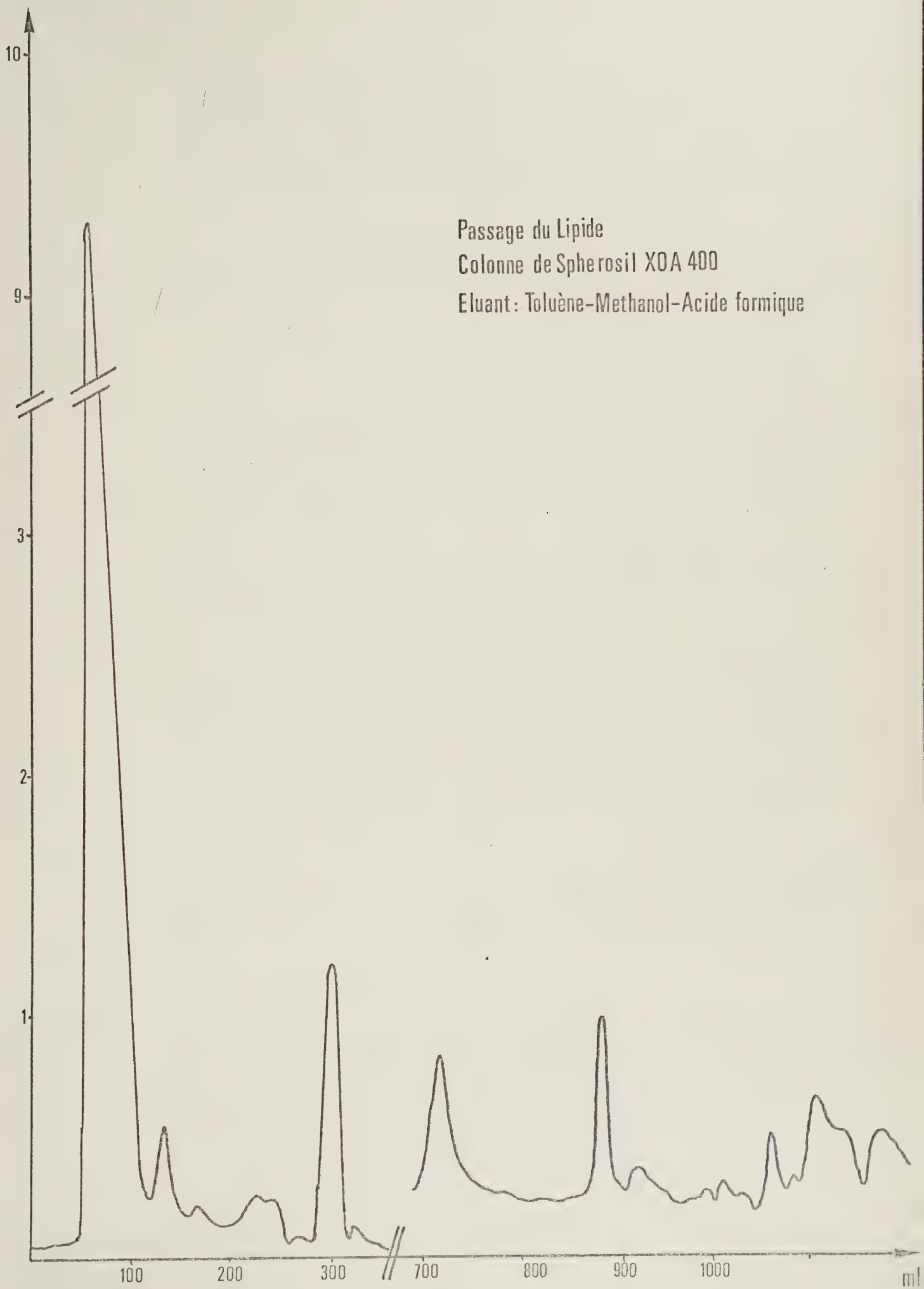

DO à 820 nm.
10
9
3
2
1
100
200
300
700
800
900
1000
ml
Passage du Lipide
Colonne de Spherosil XOA 400
Eluant : Toluène-Methanol-Acide formique

figure 9c

Pour chaque extrait, nous avons dosé la teneur en phosphore et en hexosamine. Le rapport de ces teneurs nous permettait de savoir si nous avions extrait toujours la même substance. Les rapports obtenus sont dans l'ordre 0,137 ; 0,117 ; 0,182 ; 0,175 ; et 0,155. Le rapport étant relativement identique pour tous les extraits, ces derniers ont été tous réunis.

Afin de savoir si cette substance ne reflétait pas une solubilisation partielle du Glycolipide, nous avons dosé la teneur en sucre de cet extrait. La réponse au dosage des sucres neutres était inférieure à 1 %. Nous avons appelé cette substance Lipide X.

A ce stade, nous pouvions envisager au moins trois hypothèses :

- Selon la première, le Lipide X ne serait qu'une faible partie du lipide identique à celle que nous obtenions après hydrolyse par HCl 0,25 N du glycolipide. Cette fraction de Lipide étant due à l'hydrolyse du Lipopolysaccharide par l'acide trifluoracétique.
- Selon la deuxième, le Lipide X était un contaminant de l'endotoxine.

- Enfin, la dernière supposerait que la macromolécule, nommée Lipid-A par de nombreux auteurs, ne serait pas homogène mais séparable en au moins deux fractions, ceci étant dans le cas du Lipide de l'endotoxine de B. pertussis.

Comme le Lipide X avait un rapport phosphore/hexosamine très proche de celui du Lipide que nous obtenions par hydrolyse du Glycolipide, nous avons analysé, par chromatographie en phase gazeuse, les acides gras du Lipide X. Nous avons trouvé que le chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du Lipide X était très différent de celui que nous obtenions pour le Lipide provenant de l'hydrolyse du Glycolipide (que nous appellerons Lipide A). Les résultats de ce chromatogramme seront discutés plus en détail dans le chapitre V.

Ainsi la première des hypothèses que nous avions suggérée était à écarter. Afin de vérifier ou d'écarter également la deuxième hypothèse, il nous fallait purifier le lipopolysaccharide pour éliminer toutes les éventuelles contaminations.

b) Purification du lipopolysaccharide :

Nous avons schématisé sur la figure 10 le protocole que nous avons suivi pour obtenir l'échantillon de Glycolipide (GLP-A) dont toutes contaminations seraient exclues, en partant d'un lipopolysaccharide provenant d'une seule culture de 600 l. de B. pertussis.

OBTENTION DU GLYCOLIPIDE

GLP-A

5,5g de LPS BP 35 (souche 1414 ©I).

.extraction par $CHCl_3$

filtré sur verre fritté n°2

résidu — extrait (26mg)

.extraction par le toluène
méthanol (1:1)

résidu — extrait (44mg)

.extraction par méthanol

résidu — extrait (4mg)

LPS purifié (5,445g)

.hydrolyse par 1360ml de CF_3COOH (pH 2,43)
à 50°C pendant 115h.

.centrifugation à 3000rpm, 20 minutes.

surnageant

culot lyophilisé
3,422g
GLP-A

.centrifugation 200 000g
pendant 1h 30.

surnageant — culot
36mg
GLP-B

.dialyse

940mg
PS-1

FIGURE 10

c) Obtention des différentes fractions lipidiques :

Ce Glycolipide GLP-A est alors extrait suivant le même protocole qui nous avait permis d'obtenir le Lipide X. A partir de 3,42 g de GLP-A, nous avons obtenu une fraction ayant les mêmes caractéristiques que le Lipide X (227 mg).

Il est donc possible d'obtenir deux fractions ayant les caractéristiques que l'on attribue aux Lipid-A des Entérobactéries, à partir de l'endotoxine de B. pertussis. La fraction lipidique de l'endotoxine de B. pertussis est donc dissociable en au moins deux fractions lipidiques.

Ces deux fractions ne sont cependant pas homogènes (fig.11) ainsi le Lipide X se sépare en deux fractions, que nous nommerons lipide X1 et X2. De même, le Lipide A donne deux fractions de nature lipidique : les lipides A1 et A2 mais également un extrait soluble dans le méthanol (E-MeoH), qui contient 13 % de sucres neutres et pas d'acides gras, et un résidu non soluble dans le méthanol (R-MeoH), contenant 10 % de sucres neutres et qui doit représenter le glycolipide (GLP-C) qui n'a pas été hydrolysé. Nous avions dit prédédemment que l'hydrolyse par HCl 0,25 N ne clive qu'à 80 % la liaison cétosidique du KDO.

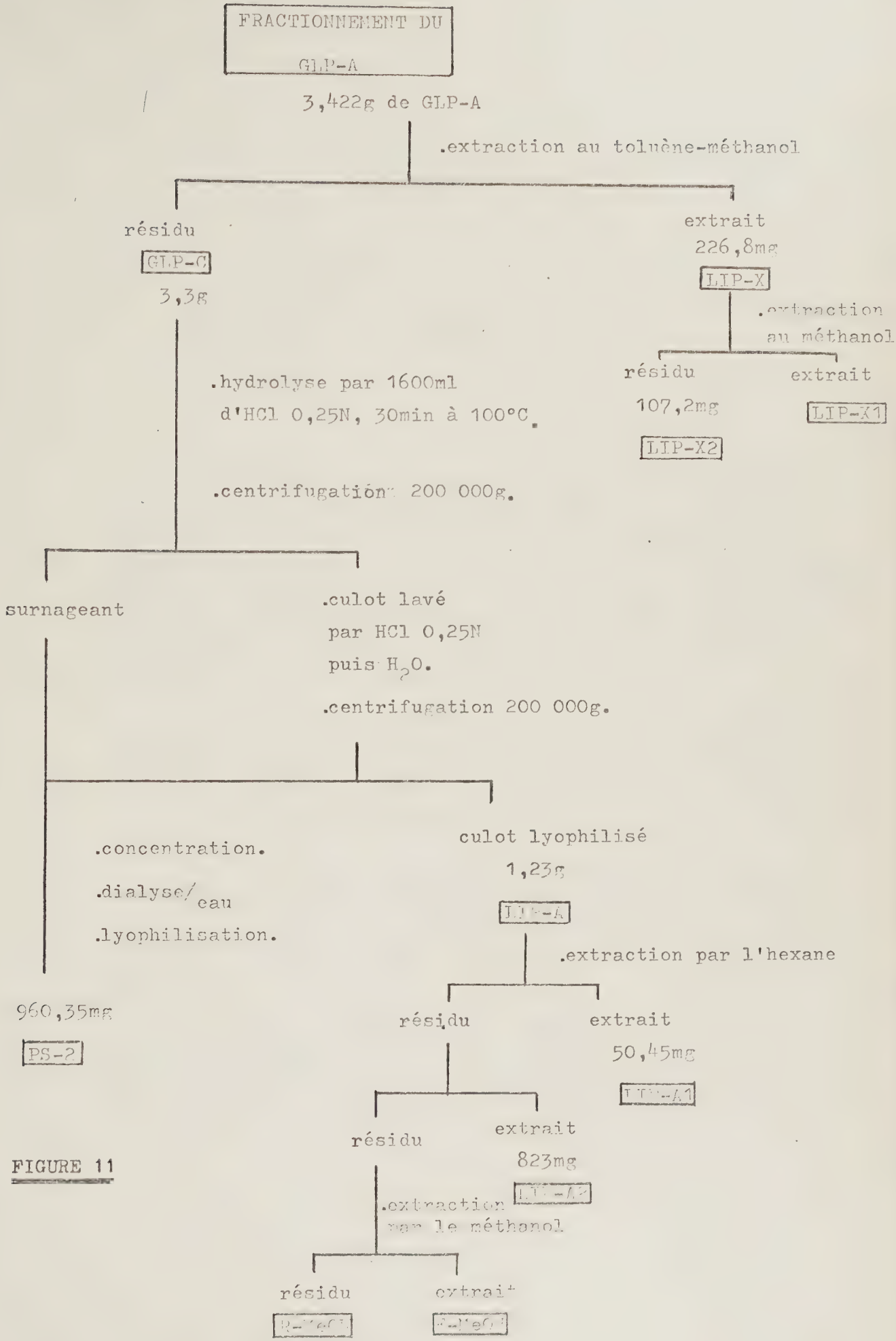

FRACTIONNEMENT DU GLP-A
3,422g de GLP-A
.extraction au toluène-méthanol
résidu
GLP-C
3,3g
extrait
226,8mg
LIP-X
.extraction au méthanol
résidu
107,2mg
LIP-X2
extrait
LIP-X1
.hydrolyse par 1600ml d'HCl 0,25N, 30min à 100°C.
.centrifugation 200 000g.
surnageant
.culot lavé par HCl 0,25N puis H_2O.
.centrifugation 200 000g.
.concentration.
.dialyse/eau
.lyophilisation.
960,35mg
PS-2
culot lyophilisé
1,23g
LIP-A
.extraction par l'hexane
résidu
extrait
50,45mg
LIP-A1
résidu
extrait
823mg
LIP-A2
.extraction par le méthanol
résidu
extrait

FIGURE 11

Chapitre III

ETUDES DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DU GLYCOLIPIDE (GLP_A).

Bien que les lipopolysaccharides aient été l'objet de nombreux travaux depuis ces dernières années, on sait très peu de choses sur les relations qui existent entre la structure et les activités biologiques provoquées par la macromolécule entière, ou par des fractions obtenues à partir des lipopolysaccharides. Ceci tient, en grande partie, au fait que les procédés chimiques, servant à obtenir les différentes fractions, ne sont pas tous contrôlables, des différences, même non décelables par des méthodes d'analyse, pouvant modifier considérablement les propriétés biologiques.

Cependant, depuis que l'on connaît l'existence de mutants R qui, comme nous l'avons dit précédemment, ne synthétisent pas un lipopolysaccharide entier, de nombreux auteurs ont montré que c'est la fraction du Lipid-A seul qui serait responsable des activités que l'on attribuait à l'endotoxine, tel le pouvoir adjuvant, l'action sur l'immunité non spécifique etc... (51-23).

Afin de pouvoir répondre à la question que nous nous sommes posée, à savoir, le Lipid-A, est-il une seule entité biologique ou bien peut-on séparer des fractions ayant des propriétés différentes, nous avons analysé du point de vue de leurs activités biologiques, toutes les fractions obtenues à partir du GLP-A.

Comme nous ne disposions pas du matériel ni de l'équipement nécessaire pour effectuer les tests biologiques sur les différentes fractions, toute l'expérimentation biologique a été effectuée à l'Institut Mérieux (Marcy-l'Etoile, Lyon) sous la direction de Monsieur AYME par son équipe.

1 - Pouvoir pyrogène et toxicité :

Tous les mammifères sont sensibles aux endotoxines, mais la réponse dépend de la voie d'introduction, de l'espèce animale, de l'individu et de la dose employée. A faible dose, l'animal peut ne présenter que quelques troubles légers comme une augmentation de la température, une chute du poids; à forte dose, les endotoxines provoquent des troubles graves comme le phénomène de Schwartzmann et la mort de l'animal.

a) Effet pyrogène :

Les lipopolysaccharides des bactéries à gram négatif se montrent fortement pyrogènes lorsqu'on les injecte aux animaux ou à l'homme (42).

L'effet pyrogène de nos différentes fractions a été testé pour chaque produit sur trois lapins. Les résultats sont exprimés par la moyenne des écarts de température ($\Sigma\Delta$ t°).

Il faut noter qu'un produit est pyrogène en pharmacologie lorsque son $\Sigma\Delta t° \geqslant 1,5$.

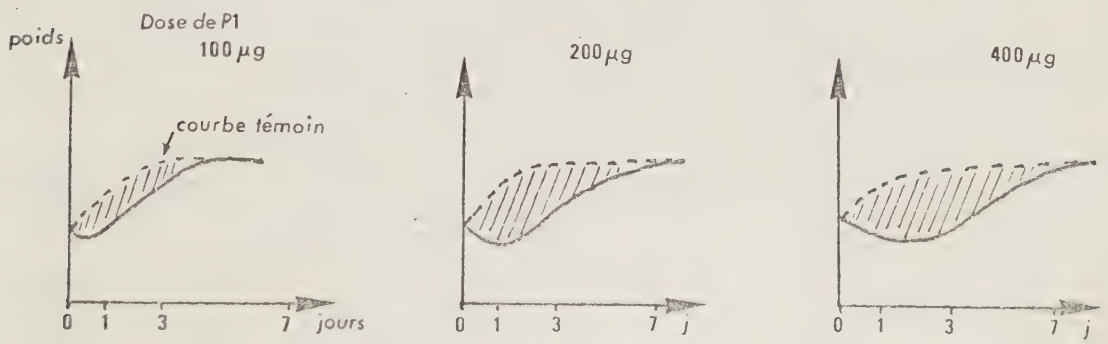
	LPS	GLP_A	GLP_B	GLP_C	LIP_X	LIP_X1	LIP_X2	LIP_A	LIP_A1	LIP_A2
$\Sigma\Delta t°$	5	5	5	6,65	5	2	4,3	1,2	0,75	1,1

Ces résultats montrent que le Lipide A ainsi que les fractions qui en résultent, ne sont que peu ou pas pyrogènes alors que tous les autres le sont fortement, à l'exception du lipide X1.

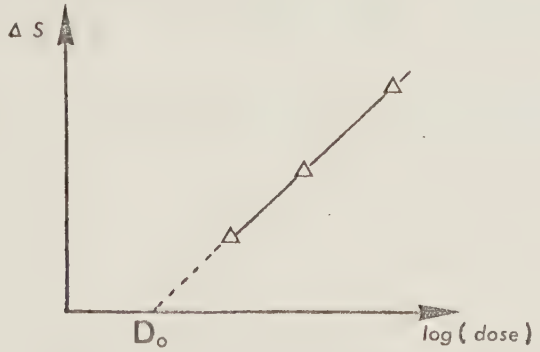
b) Le "Mouse-Weigth-Gain-Test" (MWGT):

Le MWGT consiste à prendre des souris en pleine croissance à qui l'on injecte par voie intrapéritonéale différentes doses de chaque produit à tester. On pèse les souris le jour de l'injection (J0), puis un jour (J1), trois jours (J3) et sept jours (J7) après. On trace ainsi une courbe de poids pour chaque souris. On trace également une courbe témoin correspondant aux souris ayant eu en injection, du soluté physiologique.

On mesure ensuite la surface (ΔS) obtenue entre la courbe de poids des souris témoins et celle de la souris ayant reçu une dose du produit à tester :



On trace ensuite cette surface en fonction du logarithme de la dose injectée : $\Delta S = f [\log (dose)]$. Par extrapolation, on obtient la dose limite minimale D_o pour laquelle on n'observe pas chez l'animal de perturbation de la courbe de poids. A cette dose limite, le produit n'est pas toxique.



Dans le tableau ci-dessous, nous avons porté les doses limites (D_o) obtenues pour nos différentes fractions.

	LPS	GLP A	GLP B	GLP C	LIP A	LIP A1	LIP A2	LIP X	LIP X1	LIP X2
D_o µg	<25	<25	70	<25	400	263	400	306	>400	124

Ces résultats nous montrent que les lipides A, A2, et X_1 ne sont pas toxiques à une dose de 400 µg, alors que les autres produits sonttoxiques à des doses bien plus faibles. Les GLP-A et GLP-C étant les produits les plus toxiques.

Du point de vue pharmacologique, un produit peut-être utilisé si au cours du MWGT l'animal a retrouvé son poids de départ après le troisième jour du test. C'était le cas de tous les produits sauf pour le lipopolysaccharide et le glycolipide A, pour une dose de 400 µg.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus pour l'effet pyrogène, à savoir que les lipides X et X2 sont toxiques alors que les lipides A et A2 ne le sont pas.

Les lipides X et X2 ont un pouvoir pyrogène et une toxicité différente des lipides A et A2.

c) Phénomène de Schwartzmann :

La réaction de Schwartzmann est une nécrose hémorragique de certains organes, observée après une injection d'endotoxine à un animal, ou à l'homme, présensibilisés par une première injection d'endotoxine de 6 à 48 heures auparavant. La réaction nécrotique peut être locale si la première dose d'endotoxine est injectée dans la peau, et la deuxième, par voie intraveineuse;

La réaction est généralisée quand les deux injections sont intraveineuses. La réaction peut être obtenue avec deux endotoxines sans parenté antigénique.

Dans notre étude la première injection était faite par voie intradermique (injection des différentes fractions obtenues à partir du GLP-A), et la deuxième, 10 heures après, par voie intraveineuse (cette dernière était faite avec Shigella).

Dans le tableau ci-dessous, nous avons noté s'il y a eu réaction nécrotique (+), ou pas (-).

	LPS	GLP A	GLP B	GLP C	LIP X	LIP X1	LIP X2	LIP A	LIP A1	LIP A2
REACTION NECROTIQUE	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-

L'analyse de ces premiers résultats nous indiquent qu'il y a une séparation des propriétés biologiques au niveau des lipides X, X2 et des lipides A, A2. En effet, les premiers (X, X2), sont pyrogènes, toxiques et Schwartzmann positifs, alors que les deux autres (A, A2) ne sont pas pyrogènes, ni toxiques et ne présentent pas de réaction nécrotique au test de Schwartzmann.

Cependant, à ce stade, nous ne pouvons pas dire si cette séparation est due à des différences structurales des macromolécules X et A, ou bien s'il s'agit d'une dénaturation des activités toxiques des macromolécules A par l'hydrolyse ayant servie à obtenir ces dernières.

2 - Action sur l'immunité non spécifique

On sait depuis de nombreuses années que l'injection intra-péritonéale de bactéries à gram négatif, vivantes ou tuées, confère à l'hôte une résistance accrue vis-à-vis d'un certain nombre d'agents pathogènes, comprenant aussi bien les bactéries à gram négatif ou positif que les virus (53-27). Certains auteurs ont montré que c'était la partie lipidique de l'endotoxine qui était responsable de cet effet, alors que la partie polysaccharidique était inactive (37).

Nos différentes fractions ont été testées de la manière suivante : des souris de poids moyen de 20 g reçoivent par voie intrapéritonéale, différentes doses de chaque fraction à tester : après un délai de trois jours, on leur injecte par la même voie (à l'exception de l'épreuve virale SF où l'injection est sous cutanée), une dose létale de bactéries (1) ou de virus (2).

Les résultats, figurant sur le tableau suivant, sont exprimés en % de souris survivantes.

(1) . Salmonella typhi ST.
Pseudomanas aeruginosa PA.

(2) . Virus de l'encephalomyocardite : EMC.
Virus "Semliki Forest" : SF.

Epreuve:	ST		PA		EMC	SF
Dose par souris: (µg)	50	200	50	200	200	200
LPS	30	70	0	30	100	100
GLP_ A	30	90	0	90	90	90
GLP_ B	40	70	10	40	90	90
GLP_ C	60	90	20	70	100	90
LIP _ X	20	89	10	60	70	80
LIP _ X1	0	40	0	0	70	40
LIP_ X2	40	100	10	60	100	100
LIP_ A	20	80	0	0	80	50
LIP_ A1	0	40	0	0	70	50
LIP_ A2	30	70	0	0	100	70
Témoins	0	0	0	0	25	10

%de survivants

Les résultats sur les souris témoins nous indiquent que les épreuves bactériennes sont plus drastiques, et de ce fait, plus significatives que les épreuves virales car dans les épreuves ST et PA, toutes les souris ayant reçues des doses létales de bactéries sont mortes ; alors que, dans le cas des autres épreuves, il restait un nombre relativement élevé de souris témoins vivantes.

Les résultats montrent également que le Lipide X2 est la fraction qui a le pouvoir protecteur le plus élevé lors des épreuves bactériennes, et la seule capable parmi les fractions lipidiques, de conférer une protection totale.

Pour les épreuves bactériennes et virales, les résultats obtenus pour les lipides A1 et X1 sont pratiquement identiques : pour les épreuves bactériennes, ils ne confèrent pratiquement aucune protection aux souris, et pour les autres épreuves, ils confèrent la plus faible protection. La fraction lipidique A2 a un très faible pouvoir protecteur dans les épreuves les plus significatives.

Ces données nous indiquent qu'il y a des différences très significatives des propriétés biologiques des fractions lipidiques X2 et A2 et les résultats semblent confirmer la séparation des propriétés biologiques que nous avions observée pour les pouvoirs toxique, pyrogène et nécrotique des fractions LIP-A2 et LIP-X2.

3 - Pouvoir adjuvant

STONE (46) définit le terme d'adjuvant par : "On appelle généralement adjuvant une substance qui exalte l'expression immunologique, soit par l'exagération de l'hypersensibilité de type retardé, soit par l'augmentation de la production d'anticorps. Il faut rechercher le mode d'action des adjuvants non pas dans une modification de la structure moléculaire de l'antigène, mais à un niveau d'une activité biologique non spécifique".

Nous avons déjà énoncé précédemment que BORDET (6) avait remarqué que l'endotoxine de B. pertussis était un adjuvant. FARTHING (17-18) a suggéré que c'est le Lipid-A des endotoxines qui constituerait l'élément essentiel de l'activité adjuvante.

Cependant, de nombreux auteurs (37-51) ont obtenu des pouvoirs adjuvants plus faibles pour le Lipid-A que pour le lipopolysaccharide dont il dérivait. Cet effet pouvait être dû à la très faible solubilité des fractions lipidiques. On ignore encore les mécanismes mis en jeu mais on admet que l'effet adjuvant serait attribué à une stimulation du processus de division cellulaire et de biosynthèse des anticorps. L'adjuvant le plus utilisé est l'adjuvant de Freund, il est composé d'une émulsion de bacilles tuberculeux, morts, dans l'huile de paraffine. Il faut noter que cet adjuvant ne peut être utilisé chez l'homme.

Le pouvoir adjuvant peut être mesuré par dosage de l'augmentation d'anticorps. Le titrage des anticorps dans notre étude a été effectué par la technique d'hémagglutination passive ; le titre anticorps est exprimé par l'inverse de la dilution extrême pour laquelle on observe encore une réaction positive. Pour nos différentes fractions, nous avons mesuré l'augmentation des anticorps en réponse à une injection d'un vaccin grippal (vaccin A et B) à des souris. On mesure la dose de vaccin minimale pour laquelle nous obtenons une réponse d'anticorps "anti-grippe" détectable par la technique d'hémagglutination passive. Cette mesure sert de témoin. On injecte ensuite à des souris cette dose minimale (témoin) de vaccin (A ou B), et le produit que l'on veut tester. Les deux produits vaccin + adjuvant étant mélangés dans la seringue et ainsi, injectés en même temps. 21 jours après l'injection, on dose le taux d'anticorps anti-grippe formés.

Les résultats sont donc exprimés par l'inverse de la dilution extrême. Les doses d'injection des différentes fractions étaient de 200 µg par souris.

	LPS	GLP_A	GLP_C	GLP_B	LIP_X	LIP_X1	LIP_X2	LIP_A	LIP_A1	LIP_A2
A	806	806	506	640	1613	1280	805	806	806	806
B	320	320	400	640	640	160	506	201	400	201

témoins : A = 201 , B = 101

Pour le vaccin grippal A, les résultats indiquent que, parmi les fractions lipidiques, les lipides X et X 1 ont le pouvoir adjuvant le plus élevé, supérieur à celui du lipopolysaccharide. Les lipides A, A 1 et A2 gardent le même pouvoir adjuvant que le lipopolysaccharide : ces fractions représentent donc une bonne voie de recherche pour les mécanismes de l'activité adjuvante car ces fractions ne sont pas toxiques.

Pour le vaccin grippal B, le pouvoir adjuvant des différentes fractions est plus faible, alors que pour le lipide X, l'indice de stimulation est de 8,02 dans le cas du vaccin A, il n'est que de 6,33 pour le vaccin B. Cependant, comme dans le cas du vaccin A, ce sont les lipides X qui ont le pouvoir adjuvant le plus fort.

Les lipides X et A n'apparaissent pas identiques quant à leurs activité biologiques, que ce soit le pouvoir adjuvant ou l'action sur l'immunité non spécifique.

Les résultats recueillis au cours de l'étude des propriétés biologiques de l'endotoxine de B. pertussis et des fractions en provenant, sont en accord avec les nombreux travaux qui ont été effectués sur d'autres endotoxines : ce sont bien les fractions lipidiques des endotoxines qui sont responsables des activités biologiques portées par les bactéries à gram négatif. En effet, nos deux fractions polysaccharidiques PS.1 et PS.2 ne présentent aucune des activités biologiques que nous avons testées.

Cependant, il faut bien noter que dans le cas des autres bactéries à gram négatif, les activités avaient été attribuées à la seule macromolécule appelée Lipid-A selon la terminologie de O. WESTPHAL. Par contre, dans le cas de B. pertussis, nous obtenons deux familles de lipide, les lipides X et A, présentant des différences nettes quant à leurs activités biologiques.

Les lipides X sont pyrogènes, toxiques, Schwartzmann positifs (à l'exeption du Lipide X1), ont une pouvoir adjuvant très élevé et confèrent à la souris une immunité non spécifique : alors que les lipides A ne sont pas pyrogènes, pas toxiques, Schwartzmann négatifs, conservent le pouvoir adjuvant du lipopolysaccharide de départ et possèdent une très faible action sur l'immunité non spécifique.

Il sera très difficile de savoir si cette distinction est due à une différence fondamentale de structure entre les deux familles de lipides, ou bien si cette dissimilitude provient d'une dégradation chimique des lipides A. En effet, nous savons que ces lipides diffèrent au moins au niveau de leur composition en acide gras, mais cette particularité peut-elle expliquer une si grande séparation de leurs activités biologiques ?

Cependant, ce que nous pouvons déduire de nos résultats, c'est qu'il existe sûrement, dans la macromolécule lipidique de l'endotoxine de B. pertussis, plusieurs sites stimulant les différentes activités endotoxiques.

En effet, si la perte des activités toxiques, pyrogènes et nécrotiques des lipides A peut être due à une dégradation du lipide A lors de l'hydrolyse acide (HCl 0,25 N 30 mn à 100°C), il réside néanmoins un pouvoir adjuvant dans ces lipides A. Cette activité adjuvante et celles citées précédemment seraient donc dissociables, et les lipides A ne seraient pas une seule entité biologique.

De même, si la perte des activités toxiques, pyrogènes et nécrotiques des lipides A n'est pas due à une dégradation chimique, la macromolécule lipidique de l'endotoxine intacte porterait au moins deux sites stimulant des différentes activités. Sur la fraction lipidique X2 se trouverait le site responsable de la stimulation des activités toxiques, pyrogène et nécrotiques alors que le lipide A2 n'aurait pas le pouvoir de stimuler ces activités, mais en stimule d'autres.

Chapitre IV

ANALYSES GLOBALES DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DU GLYCOLIPIDE (GLP.A).

Nous venons de voir qu'à partir de l'endotoxine de B. pertussis, il était possible d'obtenir plusieurs fractions lipidiques qui se différencient par leurs propriétés biologiques. Nous avons recherché si elles se distingaient par leur composition chimique.

Toutes les études faites sur les Lipid-A des endotoxines des bactéries à gram négatif indiquent que ces lipides sont essentiellement constitués de glucosamine, d'acide phosphorique, et d'acides gras. On note selon les auteurs, la présence d'une faible quantité d'acides aminés, cette présence pouvant provenir d'une contamination lors de l'extraction de l'endotoxine.

1 - Composition chimique des différentes fractions lipidiques :

Nous avons vu (page 21) qu'une analyse du "lipide" obtenu directement après hydrolyse du glycolipide GLP 20 montrait que ce lipide était constitué de glucosamine (14 %), de phosphore (1,86 %), et d'acides gras (61,14 %).

Nous avons alors dosé sur toutes les fractions :

a) la glucosamine : Comme nous l'avons dit dans les méthodes analytiques (p. 7), les hexosamines sont dosées par la méthode d'Elson-Morgan après une hydrolyse des échantillons par HCl 4 N, 6h à 100°C. Cette méthode permet de doser entre 0,05 et 0,1 µmoles/ml de glucosamine. Les résultats sont portés dans le tableau III.

b) le phosphore : Tous les échantillons ont été dosés après une minéralisation par H_2SO_4 (RP) à 250°C pendant 2h, par la méthode de Chen et al.(p.7). Les résultats sont portés dans le tableau III.

c) les sucres neutres : Ce dosage nous sert pour les fractions lipidiques de critère de pureté, car il est généralement admis qu'il n'y a pas de sucres neutres dans les lipides des endotoxines. Les sucres neutres ont été dosés par la méthode de Dubois (p.7). Les résultats figurent dans le tableau III.

d) les acides gras : Les auteurs qui ont étudié les lipides des endotoxines utilisent pour libérer les acides gras une hydrolyse alcaline forte. Nous montrons dans le chapitre V que dans le cas de B. pertussis, il faut utiliser une hydrolyse par HCl 4 N, 2h à 100°C, pour libérer tous les acides gras présents. Les esters méthyliques des acides gras sont obtenus suivant le protocole décrit au chapitre V(page56) . Ces esters méthyliques ont été dosés ensuite par la méthode de Snyder et Stephens (page 7). Les résultats sont portés dans le tableau III.

e) l'azote : L'azote est dosé par la méthode de Morrisson (p8).

Pour ce qui est des acides gras des fractions lipidiques A1 et X1, il faut noter que ces acides gras sont en fait essentiellement des acides gras libres, c'est-à-dire qu'ils sont dosables sans hydrolyse préalable. Ces fractions contiennent très peu de glucosamine et cette faible quantité doit probablement provenir de légères dégradations qu'ont subi les macromolécules lors des deux hydrolyses acides.

Ces dosages sur le lipide X1 nous permettent de comprendre les résultats biologiques parfois contradictoires du lipide X1 par rapport aux lipides X et X2. En effet, le lipide X1 n'était pas toxique, ni pyrogène et n'avait qu'une action très faible sur l'immunité non spécifique.

TABLEAU III: ANALYSES GLOBALES DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DE L'ENDOTOXINE.

	LPS	GLP_A	GLP_C	LIP_A1	LIP_A2	LIP_X1	LIP_X2
% Glucosamine	20	19,7	19,5	0,3	13,9	2,3	14,5
% P	2,6	2,35	2,24	0	2,55	1,07	3,02
% N	3,7	n.d	n.d	0	1,04	0,2	1,13
% Acides gras	26,8	40,1	49,1	57,2	77,8	100	66,8
% Sucres neutres	13,9	9 3	10	0,9	0,05	0,04	1,9
% de la fraction par rapport au LPS	100	63	62,1	0,93	15,1	2,08	1,97

2 - Comparaison des hydrolysats des lipides A2 et X2 par électrophorèse et par l'analyse des acides aminés :

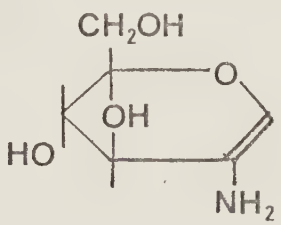
a) Comparaison des hydrolysats des lipides A2 et X2 par électrophorèse :

Nous avons soumis un échantillon (1mg) de lipide A2 et un, de lipide X2 (1mg) à une hydrolyse par HCl 4 N pendant 6 heures à 100°C.

Sur les figures 12 a et 12 b, nous avons reporté les phérogrammes obtenus après électrophorèse à pH 6,5 (4000 V, 1h10 mn) des deux hydrolysats.

Les deux phérogrammes sont très semblables. Nous observons, après révélation à la ninhydrine, trois taches majoritaires : les taches 5, 6 et 7. Les taches 5 et 7 correspondent respectivement à la glucosamine phosphate et à la glucosamine. Les taches 1 et 2 migrent comme les acides aspartique et glutamique. Les taches 3 et 4 se révèlent très faiblement, la tache 3 correspond à de l'éthanolamine phosphate.

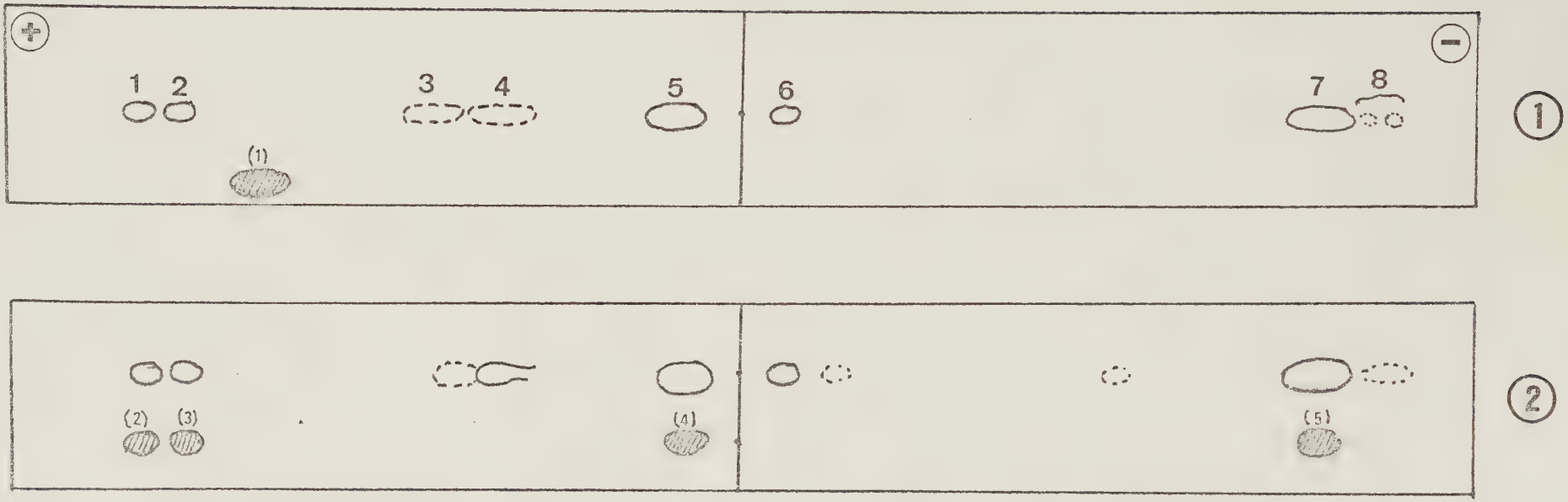
La tache 4 a été isolée en plus grande quantité après passage d'un même hydrolysat de lipide A2 sur une colonne Dowex G 50. La fraction correspondant à cette tache 4 contient du phosphore. Après déphosphorylation par une phosphatase, acétylation et analyse en spectrométrie de masse, ce produit a été identifié comme pouvant être :



glucosamine(1-2)ène.

La tache 6 contient essentiellement des produits aminés, probablement des acides aminés (voir Chapitre VI §4).

La présence d'acides aminés dans le lipide nous a suggéré qu'il pouvait y avoir une protéine dans l'endotoxine de B.pertussis. En effet, en 1960, NOWOTNY (36) avait isolé du Lipid-A de Escherichia coli, une fraction qui pouvait être une D-Glucosamine subtituée en 4 par un phosphate et en 1 par un peptide. En 1963, BURTON et CARTER (7) semblaient confirmer l'existence de ce peptide. En 1971, WOBER et ALAUPOVIC ont démontré qu'on pouvait isoler de l'endotoxine de Serratia marcesens et de Escherichia coli une protéine liée à une fraction du Lipid-A (54-55). Il nous paraissait alors justifiée d'étudier s'il y avait une protéine liée au lipide de Bordetella pertussis.



- ① figure 12-A : Electrophorèse à pH 6,5 (4000V, 1h 10min.) du lipide A2 après une hydrolyse par HCl 4N, 6h à 100°C.
- ② figure 12-B : Electrophorèse à pH 6,5 (4000V, 1h 10 min) du lipide X2 après une hydrolyse par HCl 4N, 6h à 100°C.

références : (1) acide picrique (2) acide aspartique (3) acide glutamique (4) glucosamine-phosphate (5) glucosamine.

b) Etudes des acides aminés des Lipides A2 et X2 :

Un échantillon de chacune des deux fractions a été soumis à une hydrolyse par HCl 6 N, pendant 15 h à 100°C. Les hydrolysats ont été analysés par un autoanalyseur Beckmann.

Les résultats (fig. 13) nous indiquent que nous obtenons 73 nM d'acides aminés pour le lipide A2 et 55,8 nMoles pour l'autre lipide. Cependant, si l'on compare la teneur en acides aminés par rapport à la teneur en glucosamine, nous obtenons des pourcentages très voisins : 25 % pour le lipide A2 et 23 % pour X2. Nous pouvons remarquer que les rapports relatifs des acides aminés dans les deux lipides ne sont pas toujours identiques, ainsi, il y a plus de méthionine, d'isoleucine et de leucine dans le lipide X2 que dans le lipide A2.

Cette teneur en acides aminés dans les deux lipides peut nous faire supposer qu'il existe un peptide dans ces fractions.

Il fallait savoir à présent si ces peptides sont des contaminants ou bien s'ils font partie intégrante de la macromolécule lipidique.

Pour répondre à cette question, il faudrait démontrer que ces peptides sont liés de manière covalente aux lipides.

c) Action d'un traitement alcalin doux sur les lipides A2 et X2 :

BAHAVAN et coll. (5) ont montré que si l'on avait une protéine liée glycosidiquement à une N-acétylgalactosamine, on pouvait, après traitement alcalin doux (NaOH 0,5 N, t° ambiante pendant 48h), libérer 80 % de N- acétylgalactosamine. Cette libération s'accompagne d'une destruction de sérine et thréonine égale en quantité à l'apparition de N-acétylgalactosamine dans le milieu.

TANAKA et coll. (47) ont observé des résultats analogues en traitant une autre glycoprotéine par un mélange de soude (0,1 N) et de borohydrure de sodium (0,3 M). Ils observent qu'après 216 h à 5°C, 73,1 µMoles d'hexosamines (sur un total de 102,3µM) sont libérées et que dans ce même temps, ils notent la disparition respectivement de 35,7µM et de 21,7µl de sérine et de thréonine. De nombreux autres auteurs ont utilisé des procédés très voisins pour montrer l'existence d'une liaison glycosidique entre la partie protéique et polysaccharidique d'une glycoprotéine. Il a été démontré (34) que la dégradation de sérine et de thréonine au cours de ces différents traitements alcalins était due à une βélimination.

Afin de savoir si dans notre cas les peptides des fractions lipidiques étaient liés, par l'intermédiaire d'un acide aminé hydroxylé, glycosidiquement au reste de la macromolécule, nous avons traité 1,3 mg de lipide X2 et 1 mg de

Figure 13: Etude de la composition en acides aminés

des lipides A2 et X2.

Asp.....acide aspartique
Thr.....thréonine
Ser.....serine
Glu.....acide glutamique
Gly.....glycine
Ala.....alanine
Val.....valine
Met.....métionine
Ileu.....isoleucine
Leu.....leucine

														Total des nM d'acides aminés	% par rapport à la glucosamine
LIP X2	6	3,3	4,8	6,4		8,4	7,9		3,2		4,7	3,9	7,2	55,8	23
LIP A2	8,8	4,2	7,8	11,7		13,9	10,2		4,8		2,5	2,4	6,7	73	25
	Asp	Thr	Ser	Glu		Gly	Ala		Val		Met	Ileu	Leu		

de lipide A2 par 0,5 ml de soude (0,5 N) pendant 48h à la température ambiante.

Les deux échantillons ont été ensuite neutralisés, évaporés à sec puis soumis à une hydrolyse forte par HCl 6 N 15h à 100°C puis les deux hydrolysats obtenus analysé à l'aide de l'autoanalyseur Beckmann. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 14 ci-dessous :

	lipide X2 traité	lipide X2 témoin	lipide A2 traité	lipide A2 témoin
valine	10 7	3,2	11,7	4,8
alanine	25,8	7,9	23,4	10,2
glycine	21,6	8,4	19	13,9
ac.glutamique	20,5	6,4	19	11,7
serine	9,83	4,8	9,2	7,8
thréonine	9	3,3	8	4,2
ac.aspartique	16,9	6	15,8	8,8

Afin de rendre les résultats plus facilement interprétables, nous avons choisi une valeur arbitraire pour un acide aminé, la valine, et calculé la teneur des autres acides aminés par rapport à ce dernier (valine = 2 unités). Les résultats sont inscrits dans le tableau IV.

Ces résultats paraissent en faveur d'une liaison glycosidique entre le lipide A2 et son peptide, par l'intermédiaire d'une sérine, il en est de même pour le lipide X2. En effet, on observe une perte de 50 % de cet acide aminé.

A ce stade du travail, nous ne pouvons encore expliquer la diminution assez forte que l'on note pour la glycine, ni les autres pertes qui sont toutefois plus faibles.

Nous ne pouvons pas, après cette seule expérience, affirmer que les peptides sont liés aux lipides par l'intermédiaire d'une sérine, mais ces résultats sont une forte présomption en faveur de cette hypothèse.

TRAITEMENT DES LIPIDE A2 ET X2 PAR NaOH 0,5 N

	lipide A2 traité	lipide A2 témoin	% de diminution
valine	2	2	
alanine	4	4,25	6,12
glycine	3,2	5,79	44,74
ac.glutamique	3,25	4,8	32,3
serine	1,57	3,25	51,7
thréonine	1,35	1,75	22,8
ac.aspartique	2,7	3,6	25

	lipide X2 traité	lipide X2 témoin	% de diminution
valine	2	2	
alanine	4,8	4,9	2
glycine	4	5,25	23,8
ac.glutamique	3,8	4	5
serine	1,83	3	49
thréonine	1,68	2,06	18,5
ac.aspartique	3,15	3,75	16

TABLEAU IV

Chapitre V

ETUDES DES ACIDES GRAS DE L'ENDOTOXINE DE BORDETELLA PERTUSSIS ET DE SES FRACTIONS LIPIDIQUES

RIETSCHEL et coll. ont montré (38) que les groupements aminés des glucosamines du Lipid-A des Salmonelles sont substitués par l'acide β-hydroxymyristique, alors que les groupements hydroxylés portent des molécules d'acides laurique, palmitique et 3 myristoxymyristique. Dans toutes les souches de Salmonelles étudiées, ces acides gras sont toujours présents, cependant leurs rapports respectifs varient. Il faut quand même noter que chez les Salmonelles, dans tous les cas, l'acide β-hydroxymyristique est l'acide gras majoritaire. Il n'en est cependant pas de même pour toutes les bactéries à gram négatif.

Ainsi, dans le cas de Serratia marcescens, on trouve, en plus des acides gras présents chez les Salmonelles, l'acide β- hydroxydécanoïque (2). Dans Pseudomonas aeruginosa, l'acide β- hydroxymyristique est absent et l'on trouve les acides laurique, palmitique, β-hydroxydécanoïque, 2 et 3 hydroxydodécanoïque (19). Par contre, il n'existe pas d'acides hydroxylés dans le cas de Brucella melitensis (29) et Brucella abortus (32) ; on y trouve cependant les acides palmitique, heptadécanoïque et stéarique.

Ainsi, il nous a paru utile d'examiner la composition en acides gras de l'endotoxine de B. pertussis. Nous avons également étudié la composition en acides gras de nos différentes fractions obtenues à partir du glycolipide (GLP-A), en particulier celle des fractions A2 et X2. Au cours de cette étude, nous avons voulu comparer les acides gras provenant de deux souches différentes : souche 1414 et L.84, ainsi que ceux d'une même souche mais dans des phases immunologiques différentes : les phases I et IV. Enfin, nous avons comparé les acides gras de Bordetella pertussis à ceux de Bordetella parapertussis.

1 - Etablissement d'un protocole pour l'analyse des acides gras

Comme nous allons le voir, les acides gras de B-pertussis sont fixés à la macromolécule par des liaisons de stabilité très différentes. L'analyse des acides gras nécessitait donc la mise au point d'un protocole conduisant à la libération maximale d'acides gras, sans formation concomitante de produits de condensation dus au traitement.

Les différentes méthodes de clivage des acides gras, énumérées et commentées ci-dessous sont toutes décrites dans la littérature et ont été utilisées par divers auteurs pour établir le "catalogue" des acides gras présents dans différentes endotoxines.

Nous verrons en comparant les résultats obtenus, que leur utilisation judicieuse devrait permettre d'obtenir des renseignements sur des éléments structuraux présents dans les lipopolysaccharides.

a) Traitement alcalin doux :

13 mg de lipopolysaccharide de B. pertussis L 84 (ΦI) sont extraits au chloroforme pour éliminer toute contamination d'acides gras libres. L'échantillon est ensuite traité par 2 ml de soude (0,1 N) à 0°C pendant 5 mn. La solution est alors acidifiée par addition d'une solution froide d'acide chlorhydrique. On extrait à froid par du chloroforme et on sèche la solution chloroformique sur sulfate de sodium sec. Les acides gras obtenus sont alors estérifiés par une solution éthérée de diazométhane et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatogramme obtenu présente exclusivement deux pics de même intensité. Ces pics correspondent aux acides 3-hydroxydécanoïque et 3-hydroxymyristique.

Il faut noter que ce type de traitement est fréquemment utilisé en immunologie pour solubiliser les endotoxines ou leur Lipid-A. On utilise également cette méthode pour "activer" les endotoxines dans les tests de "Passiv Immune Lysis" et de "Immune Lysis Inhibition" (3).

RIETSHELL et coll. (38) ont montré qu'un traitement du Lipid-A de Salmonella minnesota par la soude (0,25 N) à 56°C pendant 10 mn libère uniquement de l'acide 3-hydroxymyristique et de l'acide myristique. En revanche, cette hydrolyse employée pendant seulement 5 mn, libère en plus des deux acides gras précédemment cités, de l'acide myristoxymyristique.

Dans le cas de B. pertussis, lorsque nous avons soumis le lipopolysaccharide (LPS 1414 ΦI) (7,8 mg) à une hydrolyse par de la soude 0,25 N (5 mn à 56°C), nous n'avons observé essentiellement que la libération d'acides β-hydroxylés (fig. 15).

Figure 15: Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras libérés par une hydrolyse alcaline (NaOH 0,25N, 5min à 56°C). Les pics correspondent aux esters méthyliques des acides gras suivants: (1) 3-hydroxydécanoique (2) myristique, (3) Δ2-tétradécanoique, (4) 3-hydroxy-myristique.

Par chromatographie en phase gazeuse ou sur couche mince, nous n'avons pas détecté d'acide myristoxymyristique, cet acide gras serait absent chez B.pertussis.

b) Hydroxylaminolyse :

Des échantillons de 1,5 mg de "Lipide" provenant du LPS L 84 (Φ I) sont traités par une solution d'hydroxylamine préparée selon le protoxole décrit dans les méthodes d'analyse (p. 9).

Les échantillons sont maintenus à 65°C pendant des temps variables (0 à 60 mn). Ils sont ensuite centrifugés et les surnageants sont acidifiés jusqu'à pH 1. Les acides gras sont alors extraits par du chloroforme, estérifiés par du diazométhane, et dosés par la méthode de SNYDER et STEPHENS (p. 7). On observe qu' après cinq minutes de traitement, on atteint un palier qui correspond à la libération de 50 % de la totalité des acides gras présents (voir paragraphe .e.).

Les acides gras libérables par cette hydroxylaminolyse ont été étudiés par chromatographie en phase gazeuse. On observe que les acides 3-hydroxydécanoïque et myristique sont libérés en totalité par cette méthode alors que, pour libérer la totalité de l'acide 3-hydroxymyristique, il faut une hydrolyse plus forte.

En effet, une hydrolyse acide (HCl 4 N 2 h à 100°C) du précipité formé au cours de l'hydroxylaminolyse, obtenue après centrifugation de l'hydroxylaminolysat, libère exclusivement l'acide 3-hydroxymyristique (fig. 16).

c) Traitement alcalin fort :

Des échantillons de 2 mg de LPS 1414 (Φ I) sont hydrolysés par 1 ml de soude 4 N à 100°C pendant des temps variables de 0 à 8h. La solution est ensuite acidifiée jusqu'à pH 1, puis extraite au chloroforme.

La phase chloroformique est séchée puis traitée au diazométhane. Les esters d'acides gras ainsi obtenus sont dosés par la méthode de SNYDER et STEPHENS (p. 7). On observe (fig. 17) que le maximum de libération des acides gras est atteint au bout de 4 heures mais que la quantité d'acides gras ainsi saponifiée ne représente que 60 % de la quantité d'acides gras totaux.

En effet, si l'on traite la phase aqueuse restant après l'extraction au chloroforme par HCl 4 N, 2h à 100°C, on libère des acides gras non saponifiés par le traitement basique. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques de ces acides gras (fig. 18) indique l'absence de l'acide 3-hydroxydécanoïque ; c'est donc le seul à avoir été totalement saponifié au cours du traitement alcalin.

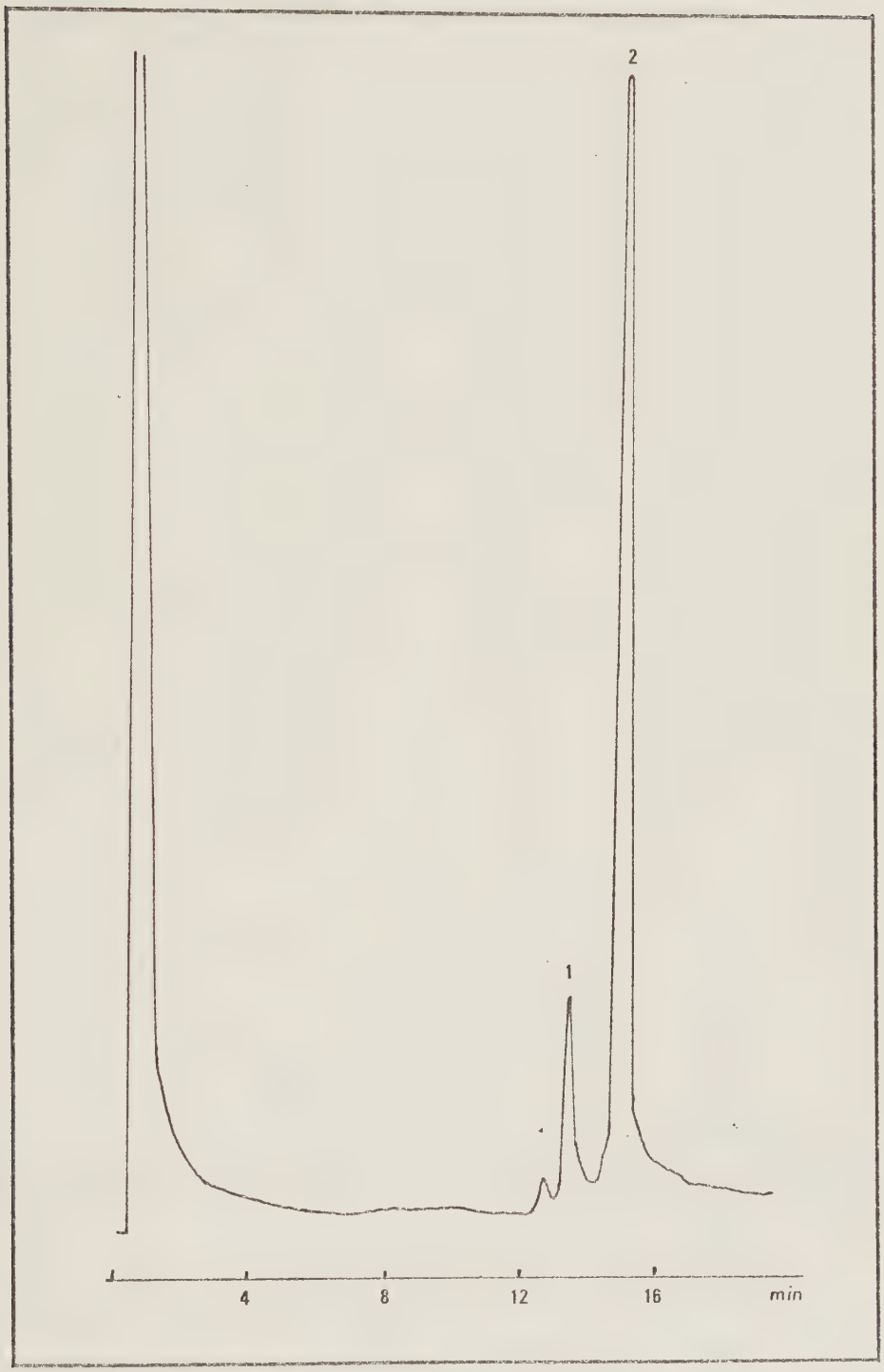
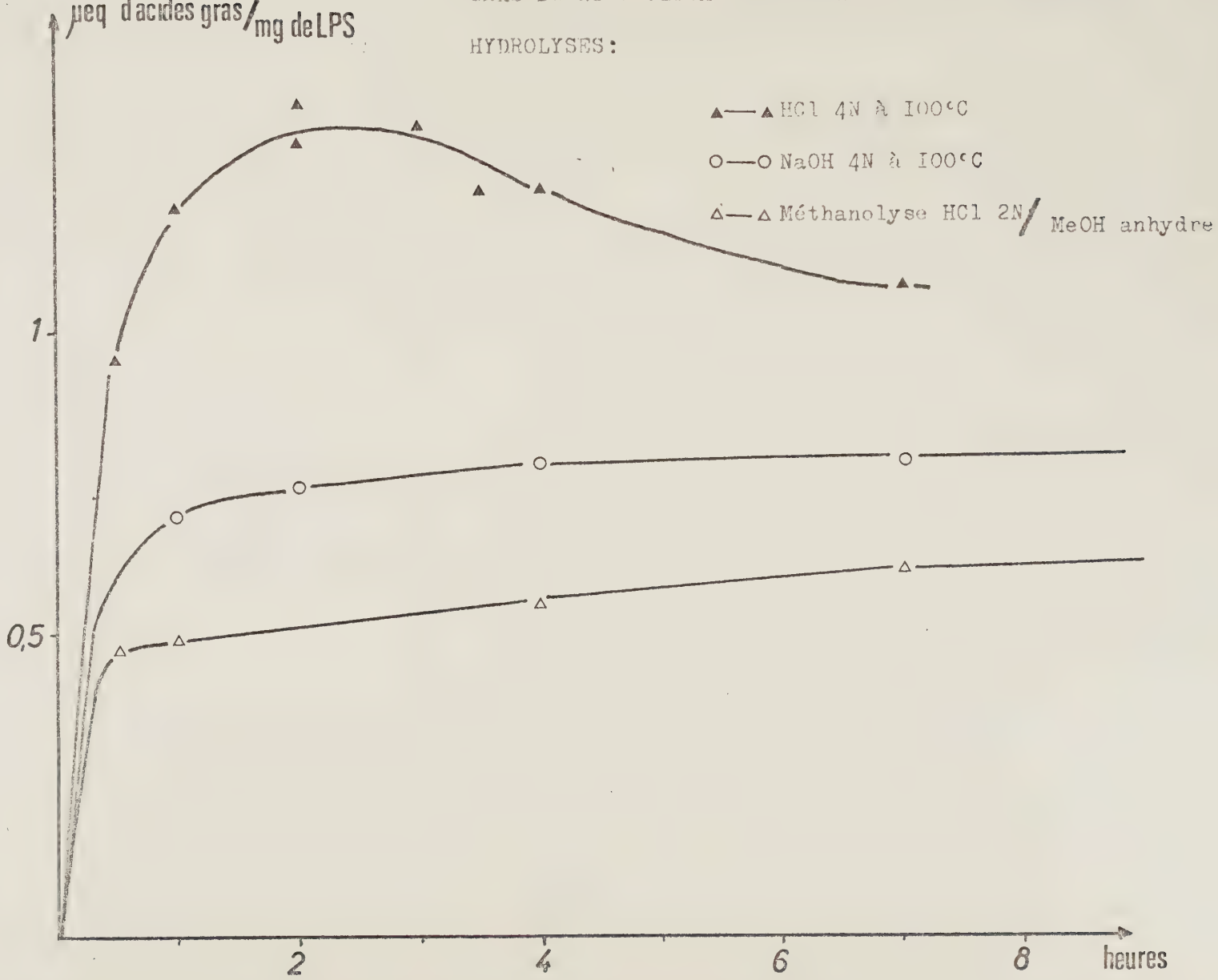


Figure 16: Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras restants après une hydroxylaminolyse, libérés par HCl 4N, 2h à 100°C. Les pics correspondent aux esters méthyliques des acides gras suivants: (1) Δ2-tétradécanoique, (2) 3-hydroxymyristique.

FIGURE 17 : CINETIQUE DE LA LIBERATION DES ACIDES GRAS DU LIPOPOLYSACCHARIDE AU COURS DE DIFFERENTES HYDROLYSES:



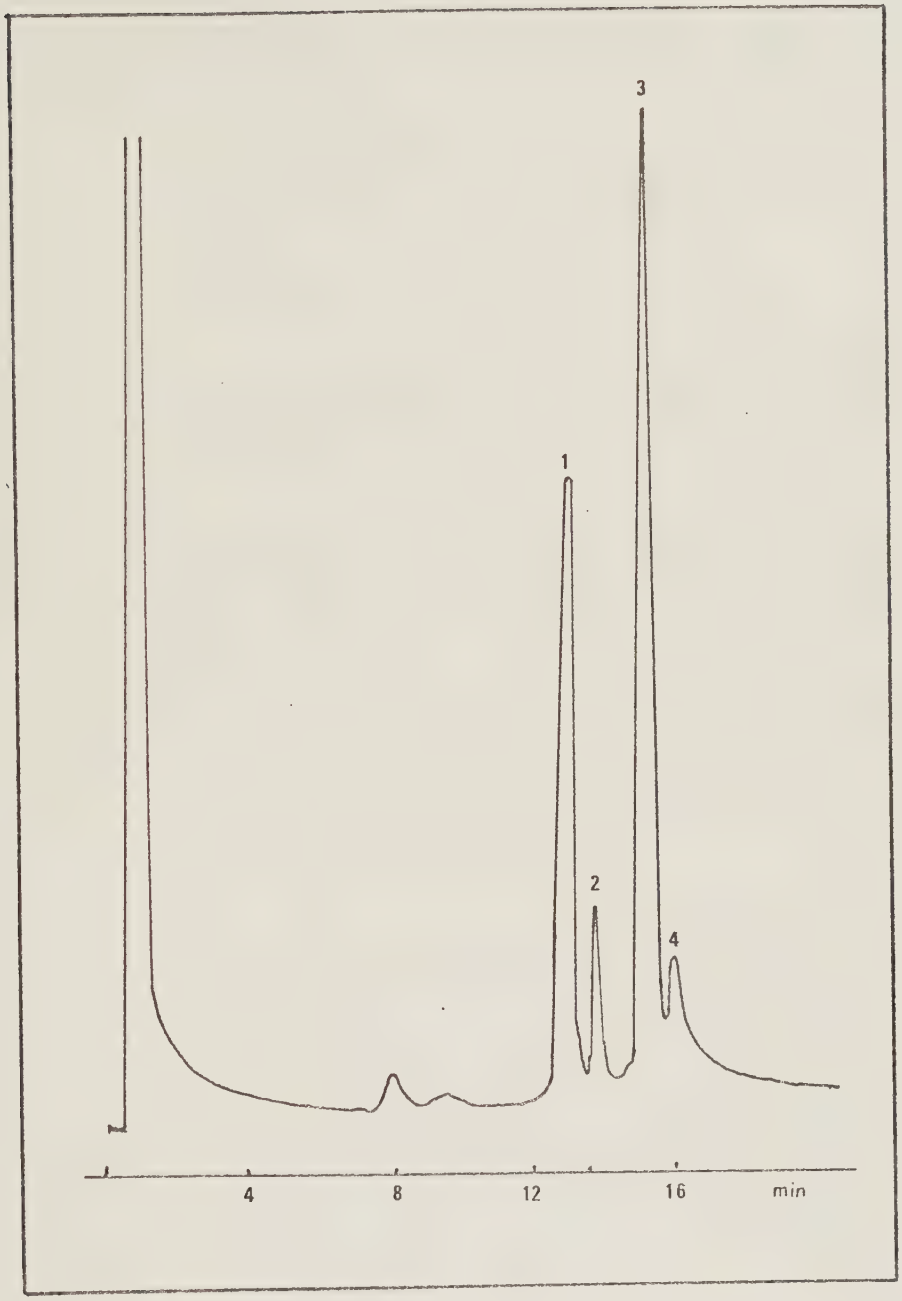


Figure 18: Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras restants après un traitement alcalin fort, libérés par HCl 4N, 2h à 100°C. Les pics correspondent aux esters méthyliques des acides gras suivants: (1) myristique, (2) Δ 2-tétradécanoique, (3) 3-hydroxymyristique, (4) palmitique.

Il paraît intéressant de noter que l'acide myristique est libéré en totalité par l'hydroxylaminolyse alors que ce même acide gras n'est pas totalement saponifiable par la soude 4 N.

d) Méthanolyse :

Des échantillons de 2 mg de LPS 1414 ΦI sont incubés à 90°C dans 1 ml d'une solution d'HCl (2 N) dans du méthanol anhydre, et les esters méthyliques sont dosés.

On observe (fig. 17) que la méthanolyse comme l'hydroxylaminolyse ou le traitement alcalin ne libère pas la totalité des acides gras : on ne libère que 42 % au bout de 4 h.

e) Hydrolyse acide forte :

Les traitements précédents étant insuffisants pour libérer les acides gras fixés par une liaison très solide, probablement amide, nous avons cherché les conditions optimales pour les cliver par une hydrolyse acide forte.

Des échantillons de 2 mg de LPS 1414 (ΦI) sont hydrolysés par HCl 4 N, à 100°C pendant des temps variables (0 à 8h). Les acides gras libérés sont dosés après estérification On observe (fig. 17) qu'au bout de 2 heures, on atteint un maximum.

Toutefois, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques obtenus après cette hydrolyse acide présente des produits dont les temps de rétention sont de près du triple de ceux obtenus par saponification. Ces produits correspondent à des produits plus lourds (fig. 19)

Une chromatographie sur couche mince de silice (solvant B) des esters méthyliques de l'hydrolysat acide présente 5 zones dont l'élution et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse (fig. 20 et 21) ont permis d'identifier tous les esters inter-moléculaires résultant de la condensation des acides gras sur le groupement hydroxyle des acides 3-hydroxylés. Ces artefacts de condensation inter-moléculaire formés en milieu acide ont été mis aussi en évidence par la formation d'une série de produits analogues, observés sur couche mince de silice (solvant A) après incubation de l'acide 3-hydroxymyristique pur à 100°C pendant 2h dans HCl 4N.

f) Protocole utilisé pour l'analyse des acides gras :

Sur la base des études précédentes, nous avons choisi d'hydrolyser l'endotoxine à étudier d'abord par HCl 4 N, 2h à 100°C, puis d'ajouter de la soude jusqu'à l'obtention d'une solution 2 N en soude et de saponifier pendant deux heures.

On acidifie ensuite le milieu jusqu'à pH 1 par addition d'HCl et on extrait les acides gras par du chloroforme. La solution chloroformique est séchée puis traitée par du diazométhane.

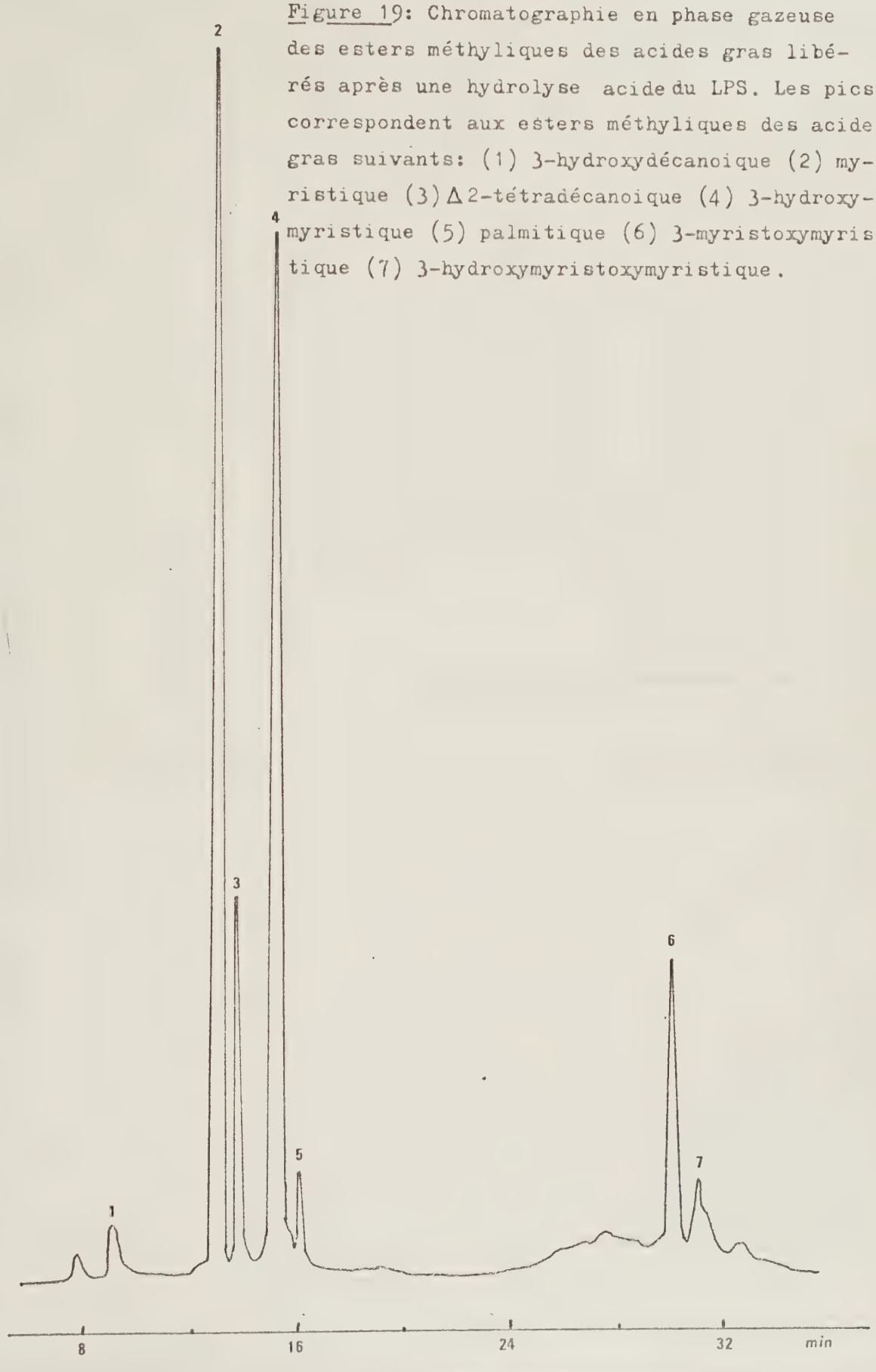


Figure 19: Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras libérés après une hydrolyse acide du LPS. Les pics correspondent aux esters méthyliques des acides gras suivants: (1) 3-hydroxydécanoique (2) myristique (3) Δ2-tétradécanoique (4) 3-hydroxymyristique (5) palmitique (6) 3-myristoxymyristique (7) 3-hydroxymyristoxymyristique.

FIGURE 20: SPECTRE DE MASSE DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE 3-MYRISTOXYMYRISTIQUE.

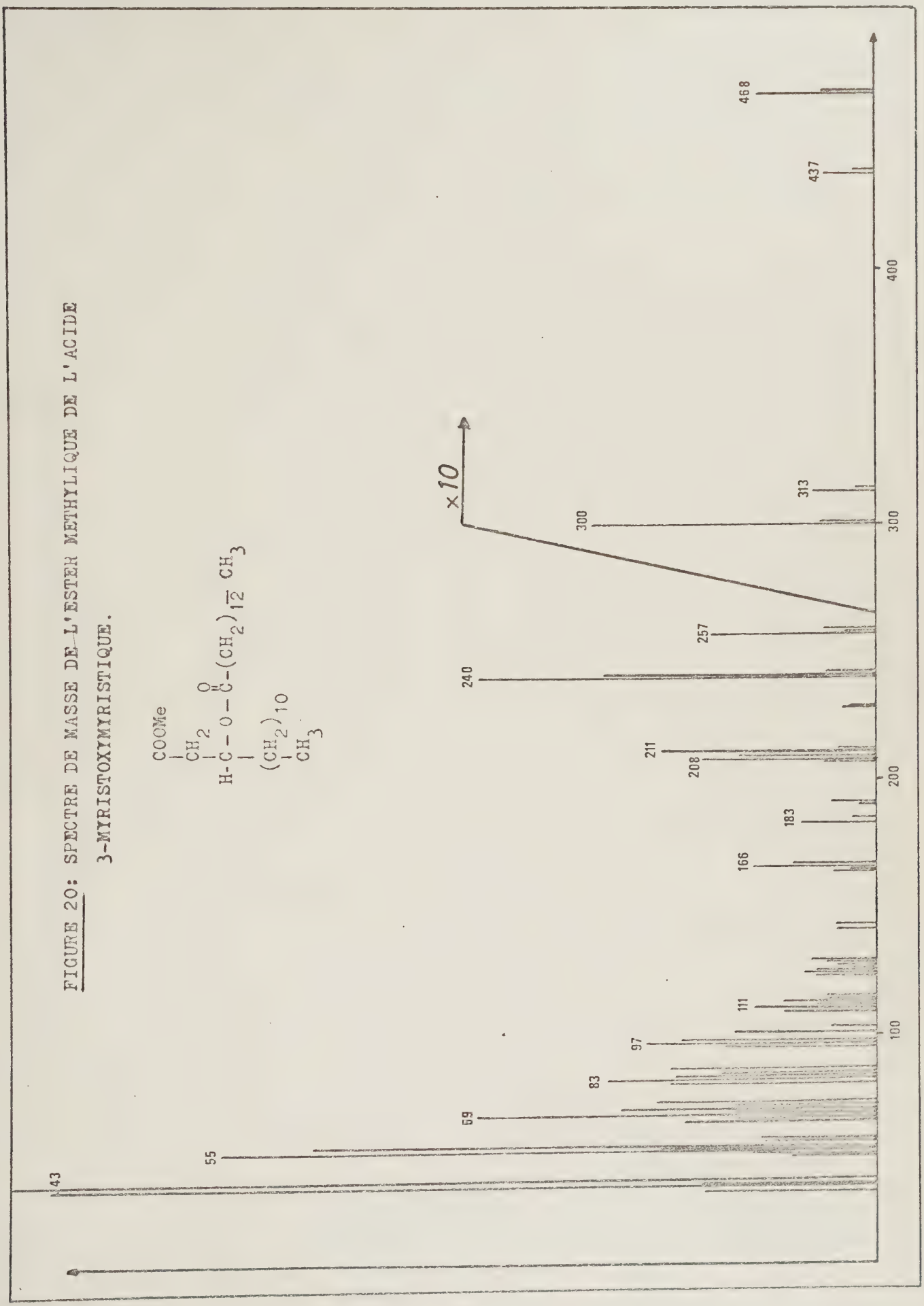
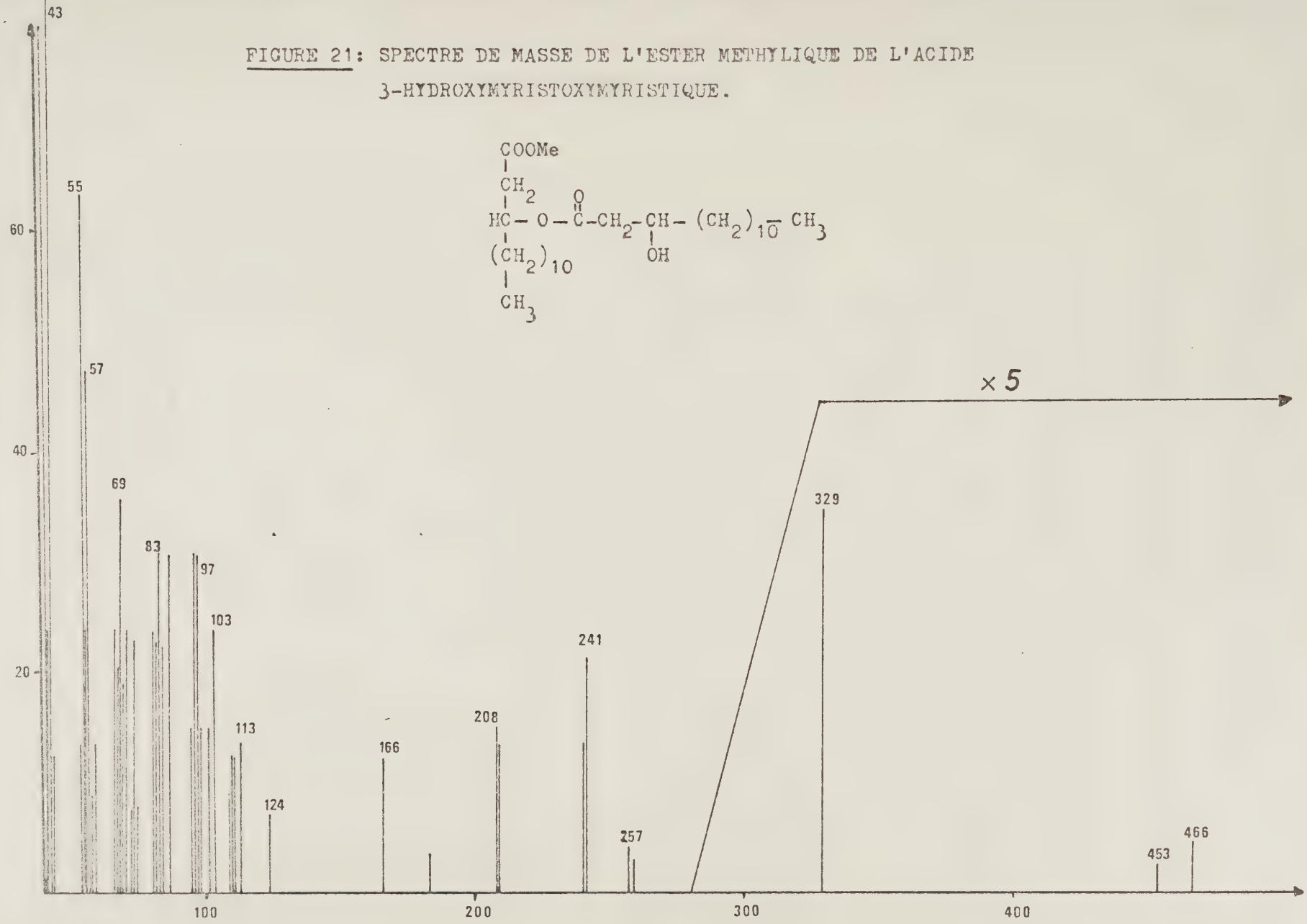


FIGURE 21: SPECTRE DE MASSE DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE 3-HYDROXYMYRISTOXYMYRISTIQUE.



Ce protocole permet, dans un premier temps, de libérer le maximum d'acides gras puis de saponifier les produits de condensation formés au cours du traitement acide.

2 - Etude des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

a) Comparaison des lipopolysaccharides de B.pertussis des souches L 84 ΦI et IV et 1414 :

En suivant le protocole que nous avons élaboré pour libérer les acides gras des endotoxines, nous avons analysé la composition en acides gras des endotoxines suivantes :

LPS L 84 ΦI et IV } Bordetella pertussis
LPS 1414 ΦI }
LPS Bordetella parapertussis N. C. T. C. 8250.

Les LPS L 84ΦI et IV présentaient des chromatogrammes identiques : il n'y a pas de différence détectable dans la composition en acides gras entre la souche L 84 en phase I ou phase IV (fig. 22-1). De même, les LPS des souches L 84 et 1414 et LPS N. C. T. C. de B. parapertussis ne présentent pas de différences notables quant à leur composition en acides gras (fig. 23-1 et 24-1). Ces chromatogrammes présentent six pics principaux qui ont été identifiés par spectrométrie de masse.

Il s'agit des esters méthyliques de :

- l'acide 3-hydroxydécanoïque..... Me CIO 3OH
- l'acide myristique..... Me CI4
- l'acide Δ2 tétradécanoïque..... Me Δ2 CI4
- l'acide 3-hydroxymyristique..... Me CI4 3OH
- l'acide palmitique..... Me CI6
- l'acide 3-hydroxydodécanoïque..... Me CI2 3OH

Il faut noter que l'acide Δ2 tétradécanoïque provient probablement d'une dégradation de l'acide 3-hydroxymyristique. La formation de ce même produit a été signalé par RIETSCHEL (38) après un traitement alcalin du Lipid-A de Salmonella minnesota R 595. Le pourcentage en Me Δ2 CI4 doit donc être rajouté à celui du Me CI4 3OH si l'on veut obtenir une estimation plus juste de la composition en acides gras des LPS.

Nous avons calculé les pourcentages relatifs de chaque acide gras à partir de l'aire de chaque pic par rapport à la somme des aires de tous les pics du chromatogramme. Les résultats sont notés dans le tableau V. Ainsi, pour les souches L 84 et 1414, nous n'observons pas de grandes différences dans les pourcentages relatifs des acides gras ; on note un pourcentage un peu plus élevé des acides hydroxydécanoïque et 3-hydroxydodécanoïque pour le LPS de la souche 1414.

Les LPS de B. pertussis et de B. parapertussis sont, par contre, très différents quant à la proportion relative de leurs acides gras. On peut également remarquer que le Me CI2 3OH est absent chez B.parapertussis.

b) Etudes des acides gras présents dans les différentes fractions provenant du GLP-A :

Comme pour les LPS, les acides gras ont été étudiés par chromatographie en phase gazeuse en suivant le protocole établi précédemment (Chapitre V paragraphe 1 p 56). Le résumé des chromatogrammes obtenus est porté sur la figure 25 alors que nous avons représenté les chromatogrammes des lipides A2 et X2 (fig. 26-1 et 27-1) car les chromatogrammes de ces deux fractions sont très différents. En effet, si le chromatogramme du lipide A2 ne se différencie pas de celui du LPS de départ (LPS 1414), celui du lipide X2 s'en différencie, non seulement par les pourcentages relatifs des acides gras présents, mais également par la nature de ces acides gras.

Dans le cas du lipide X2, l'acide myristique devient l'acide gras majoritaire. Nous observons aussi sur le chromatogramme deux pics supplémentaires. Le temps de rétention de ces deux composés est modifié par une acétylation, cette modification nous indique qu'il s'agit d'acides hydroxylés.

L'analyse des spectres de masses des deux acides acétylés et non acétylés a permis de les identifier comme étant les acides 2Me-3-hydroxydécanoïque et 2Me-3- hydroxytetradécanoïque (fig. 28 et 29). Ainsi les lipides A2 et X2 se différencient tant par les pourcentages (tableau V) que par la composition des acides gras qu'ils contiennent. Nous avons vu au chapitre III que les activités biologiques de ces deux fractions étaient très différentes mais nous ne pouvons à l'heure actuelle affirmer si la seule présence d'acides gras différents dans ces deux fractions est responsable de cette disparité.

3 - Nature des liaisons des acides gras dans l'endotoxine et dans ses fractions lipidiques :

Afin de déterminer si les acides gras présents dans l'endotoxine ou dans ses fractions lipidiques sont engagés dans une liaison amide ou ester, nous avons soumis les différents échantillons à une hydroxylaminolyse. Un tel traitement, très sélectif, n'atteint que les liaisons esters.

Ainsi, 4 mg de LPS L 84 ΦIV ; LPS 1414 ΦI: LPS parapartussis ; lipide A2 et X2 ont été traités par une solution d'hydroxylamine (p 9) à 65°C pendant 10mn, puis les solutions sont centrifugées.

a) le surnageant : les acides gras, sous forme d'hydroxamates, présents dans le surnageant sont extraits après acidification. L'extrait chloroformique est séché puis traité par une solution éthérée de diazométhane. Les esters méthyliques des acides gras libérés par l'hydroxylamine et donc engagés dans une liaison ester, sont analysé par chromatographie en phase gazeuse (fig. 22-2, 23-2, 24-2, 26-2 et 27-2).

b) le culot : Celui-ci est lavé à l'éthanol (pH neutre), séché et soumis à une hydrolyse acide (HCl 4 N, 2h à 100°C). Les acides gras, libérés par cette hydrolyse qui n'étaient donc pas libérables par l'hydroxylamine , sont extraits au chloroforme, puis séchés et estérifiés par du diazométhane. Ces esters méthyliques, probablement engagés dans une liaison amide, sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (fig. 22-3, 23-3, 24-3, 26-3, 27-3).

Nous pouvons résumer les résultats de la manière suivante :

- l'acide 3-hydroxydécanoïque : entièrement sous forme ester dans tous les échantillons

- l'acide myristique : probablement sous forme ester car totalement libérable par NH_2OH (une fraction n'est cependant pas saponifiable par NaOH 4 N. La signification de ce résultat est encore inconnue)

- l'acide 3-hydroxymyristique : une fraction est sous forme ester, l'autre, sous forme amide, sauf pour le LPS de parapertussis qui n'a pas de Me CI4 3OH sous forme ester.

- L'acide palmitique : la majorité est sous forme amide, sauf pour le LPS de B.parapertussis ou la majorité de cet acide apparaît sous forme ester.

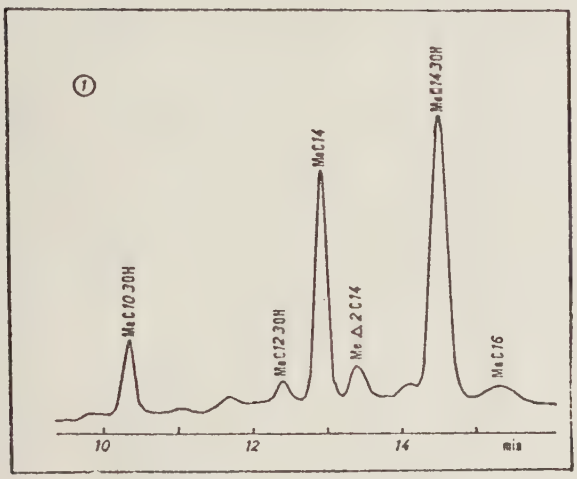
- l'acide 2 méthyl 3-hydroxytétradécanoïque : une fraction sous forme ester, l'autre sous forme amide.

- l'acide 3-hydroxydodécanoïque : uniquement sous forme ester.

- l'acide 2-méthyl 3-hydroxydécanoïque : uniquement sous forme amide.

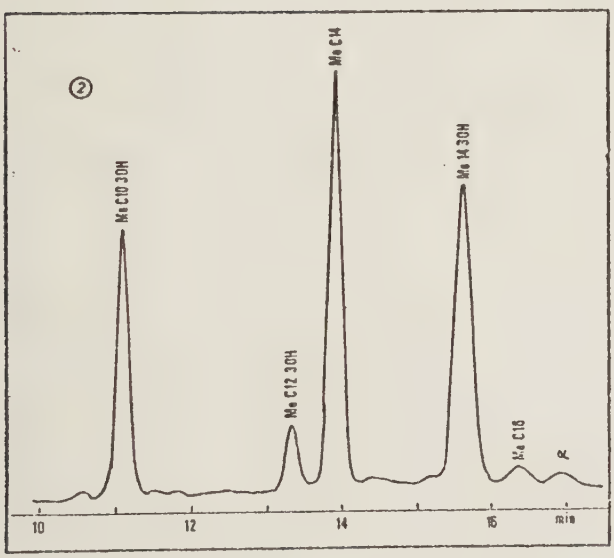
Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques

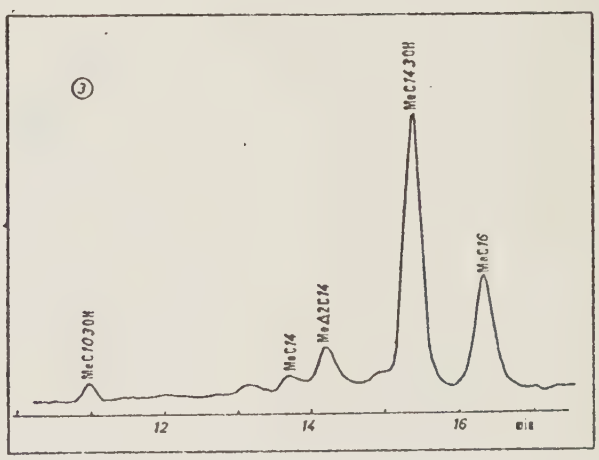
du LPS L84 $\begin{cases} \Phi \text{ IV} \\ \Phi \text{ I} \end{cases}$ de Bordetella pertussis



Colonne SE 30 (3%) 1,5m × 3,2 mm
température programmée:
8°C par min. de 100°C à 250°C

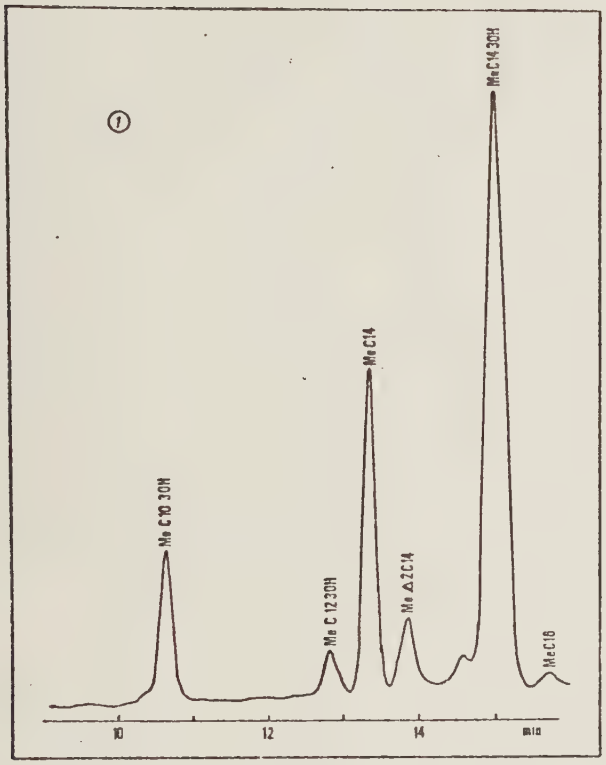
FIGURE 22





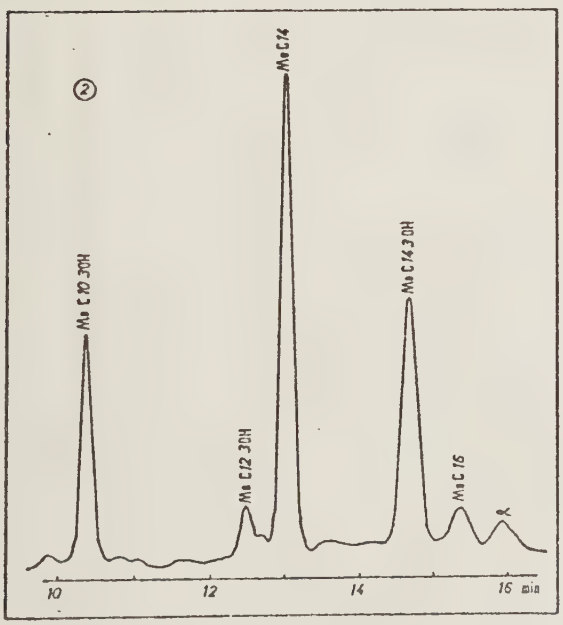
Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques

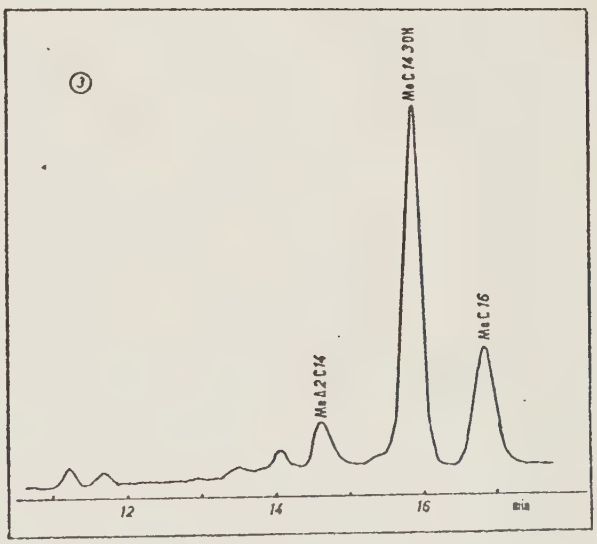
du LPS *1414* Φ I de Bordetella pertussis .



Colonne SE 30 (3%) 1,5m×3,2mm
température programmée:
8°C par min. de 100°C à 250°C

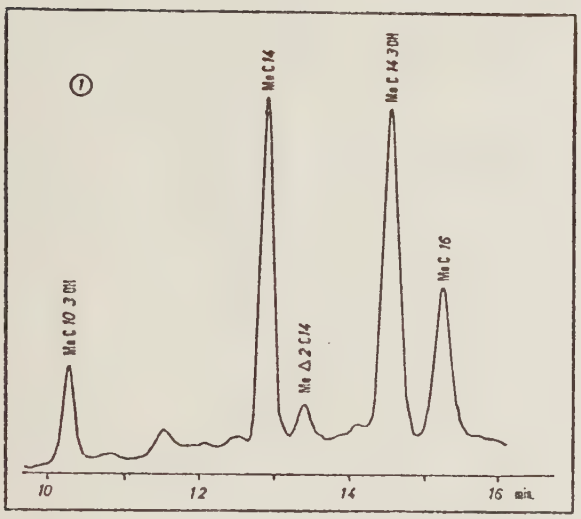
FIGURE 23





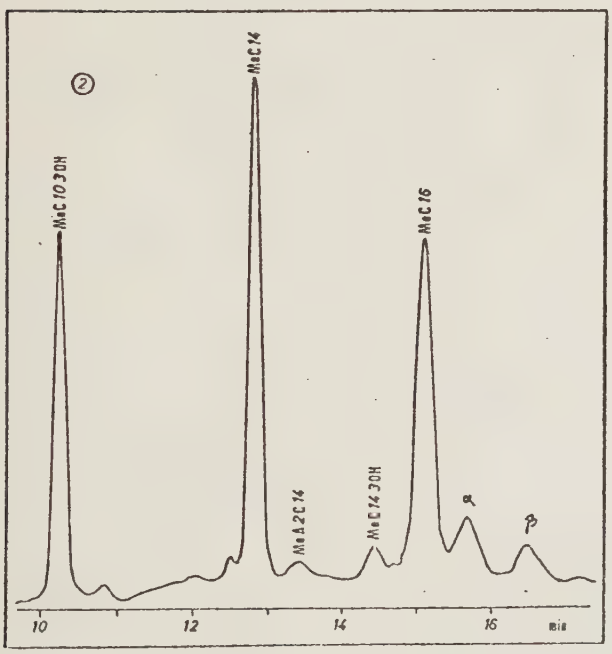
Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques

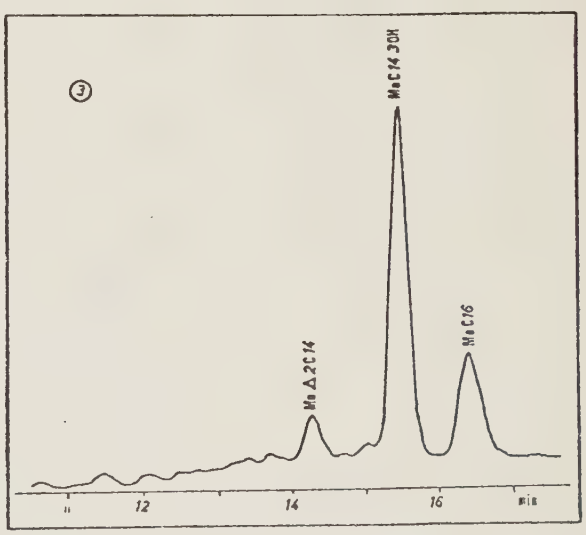
du LPS N.C.T.C *8250* de Bordetella parapertussis



Colonne SE 30 (3%) 1,5m × 3,2mm
température programmée:
8°C par min. de 100°C à 250°C

FIGURE 24





	Me C10 3OH	Me X1(1)	Me C12 3OH	Me C 14	Me C14 3OH	Me C14 3OH corrigé	Me C 16	Me X2(2)
LPS BP. L 84 Φ IV	10	0	2,6	29,13	51,17	55,83	2	0
LPS BP. 1414 Φ 1	13,17	0	3	27,75	53,39	57,8	2,3	0
LPS B.parapertussis	7,7	0	0	30	38,4	42,1	17,6	0
Lipide A2	10,43	0	3	21,77	58,8	63,8	1	0
Lipide X2	5,57	2	1,8	40,24	33,6	38,3	0	12,1

Tableau V : % RELATIFS DES ACIDES GRAS CONTENUS DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS ANALYSEES.

(1) Me C 10 2 CH_3 3OH

(2) Me C 14 2 CH_3 3 OH

ETUDES DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS OBTENUS A PARTIR DES FRACTIONS LIPIDIQUES.

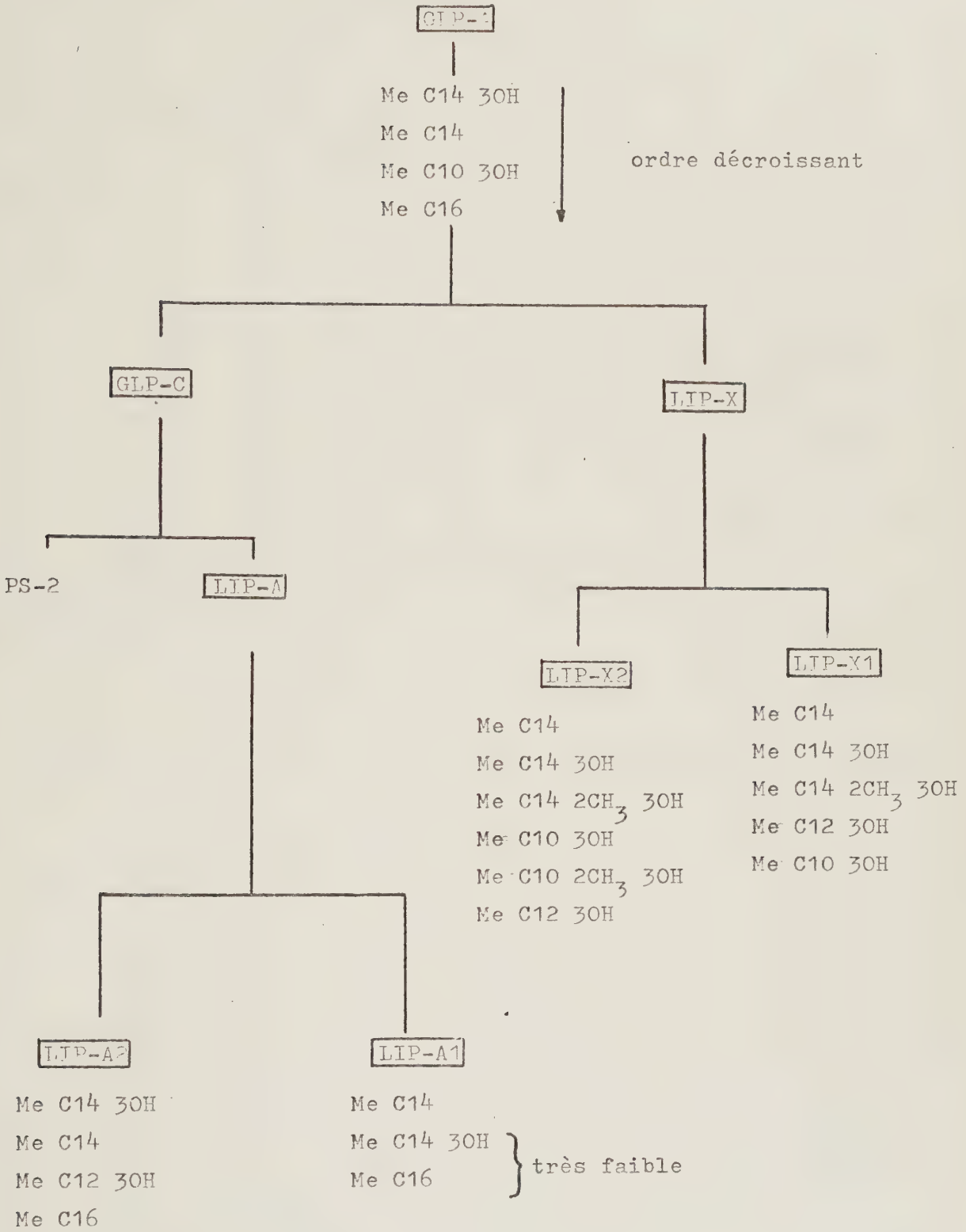
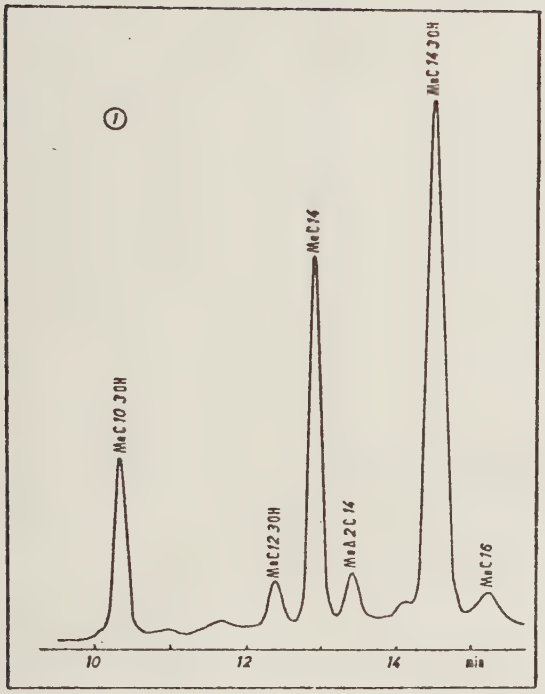


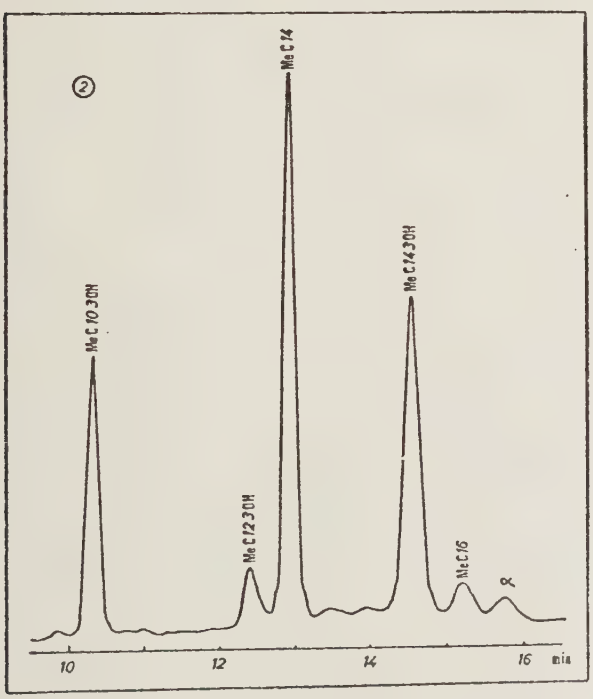
FIGURE 25

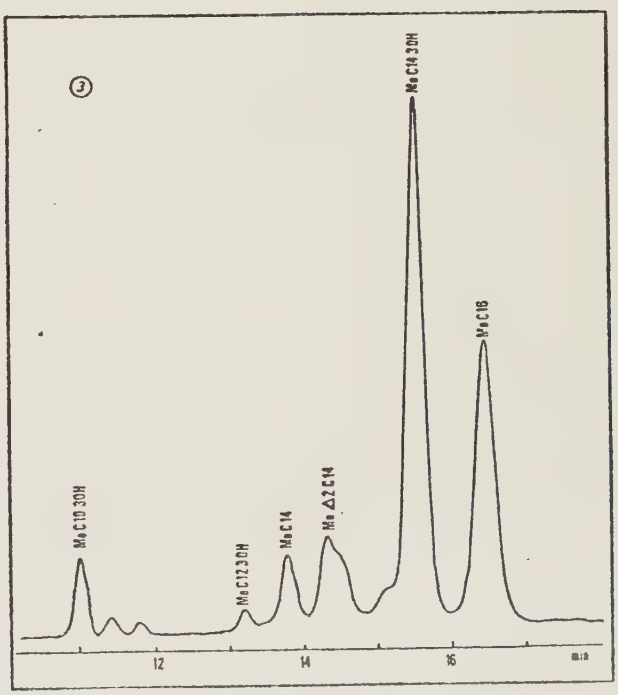
Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques du Lipide A2



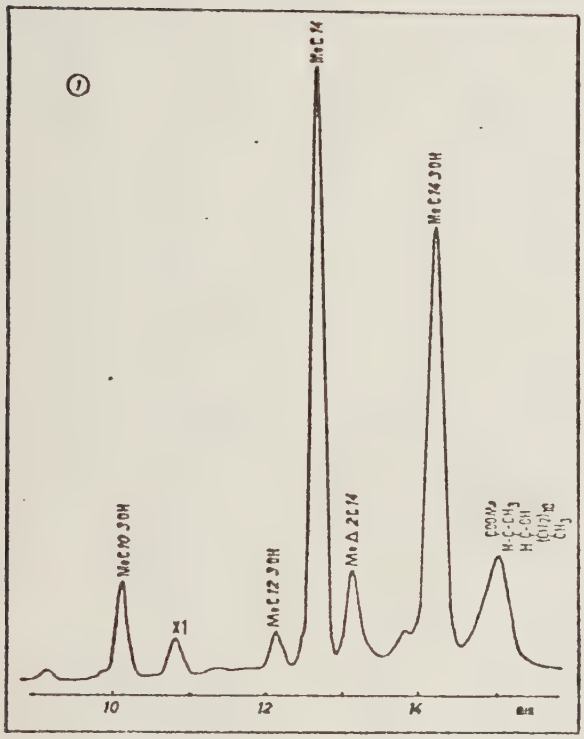
Colonne SE 30 (3%) 1,5m × 3,2mm
température programmée:
8°C par min. de 100°C à 250°C

FIGURE 26



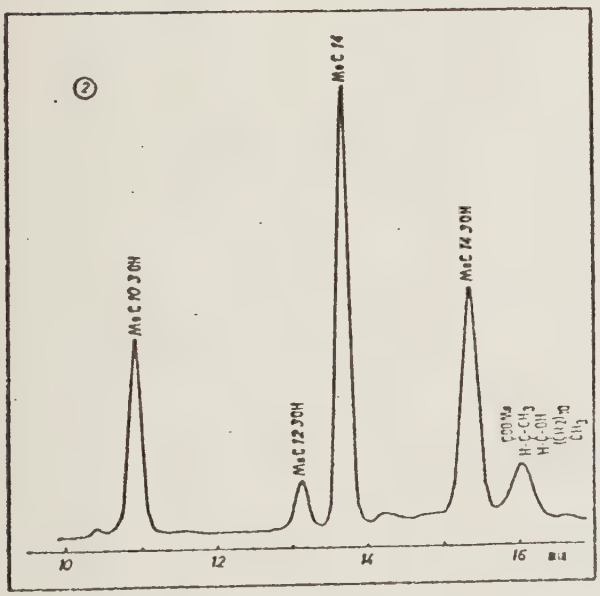


Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques du Lipide X2



Colonne SE 30 (3%) 1,5m × 3,2mm
température programmée:
8°C par min. de 100°C à 250°C

FIGURE 27



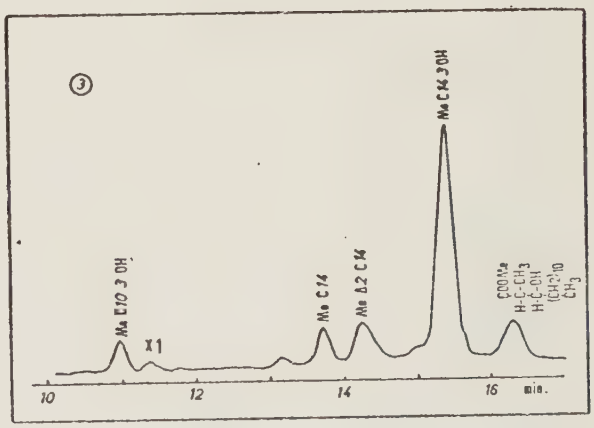


FIGURE 28: SPECTRE DE MASSE DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE 2-Me-3-HYDROXYTETRADECANOIQUE.

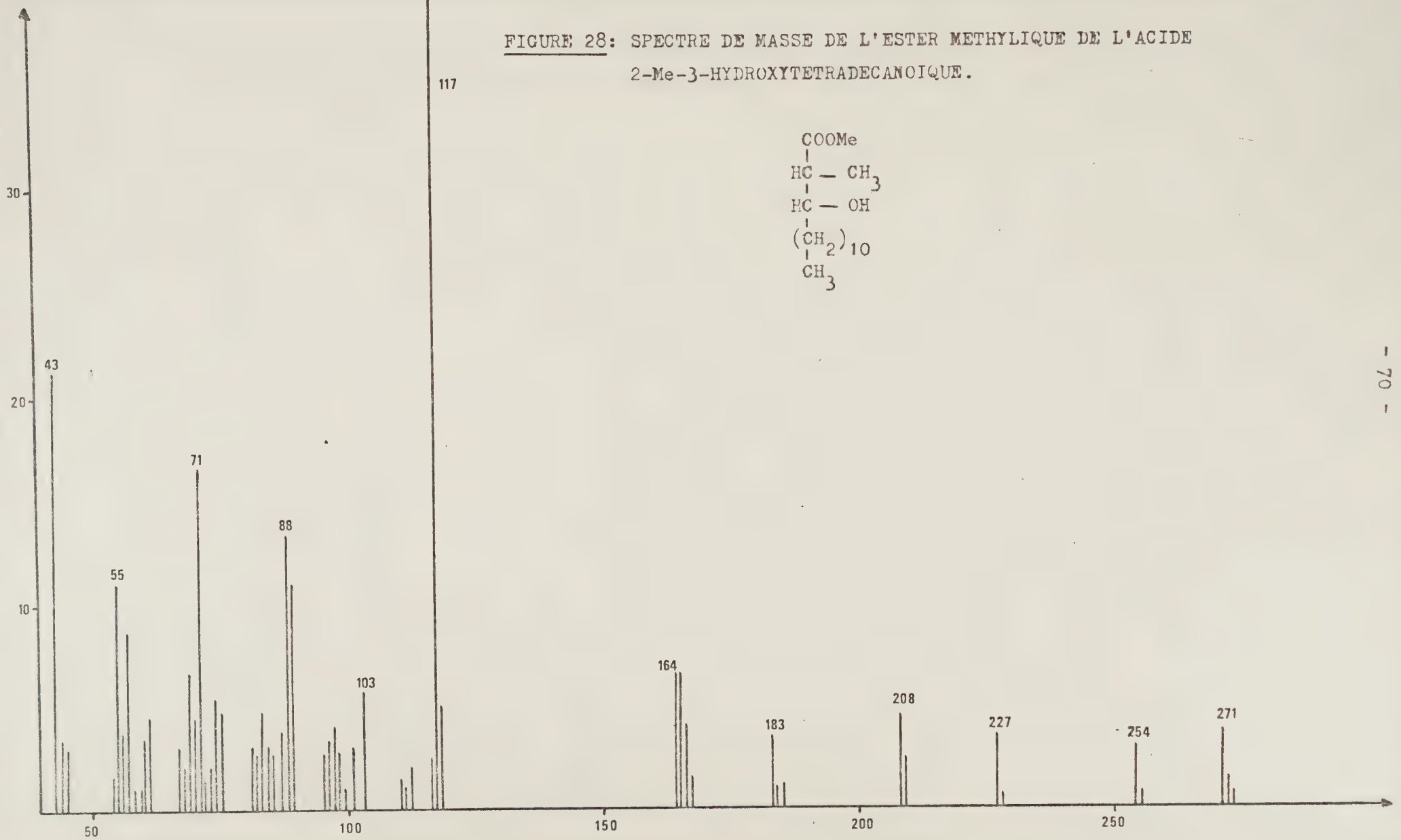
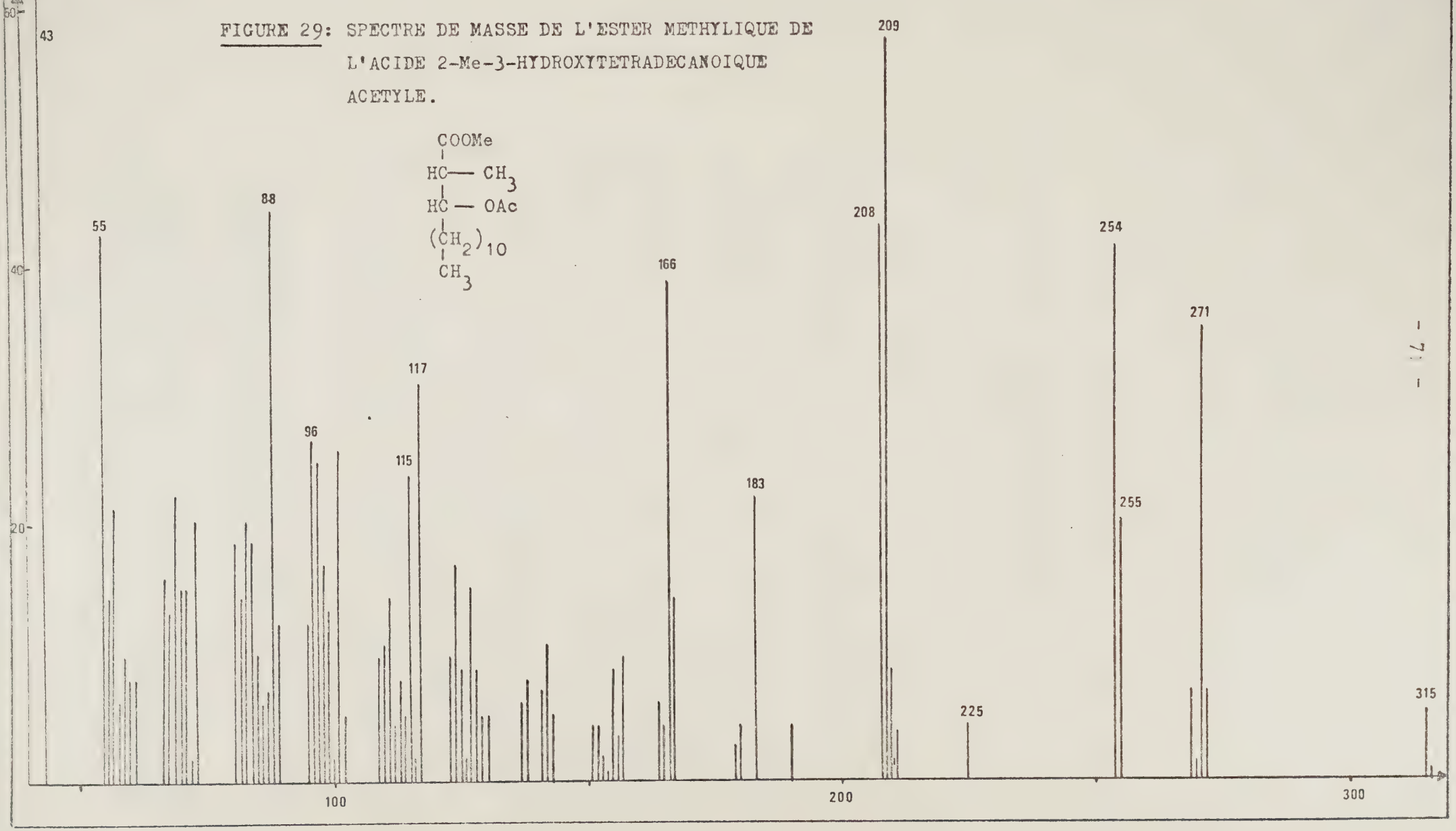


FIGURE 29: SPECTRE DE MASSE DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE 2-Me-3-HYDROXYTETRADECANOIQUE ACETYLE.



Chapitre VI

ETUDES STRUCTURALES DES LIPIDES A.

Nous avons vu que 5,5 g de lipopolysaccharide brut permettait d'obtenir 100 mg de lipide X2 et 800 mg de lipide A2.

Il nous a paru donc préférable, pour des raisons pratiques évidentes, de commencer les études structurales des lipides par l'étude des lipides A.

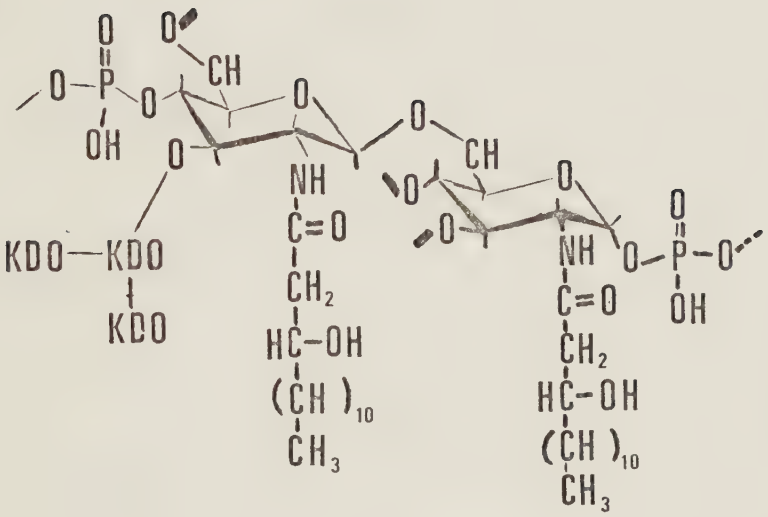
LUDERITZ et coll (32) postulent que le Lipid-A des Salmonelles et de nombreuses autres bactéries à gram négatif, auraient pour squelette un enchaînement de dimères de glucosamine, reliés par des ponts pyrophosphates. Nous avons schématisé la structure d'une unité de Lipid-A sur la figure 30, cette unité étant répétitive de deux à quatre fois.

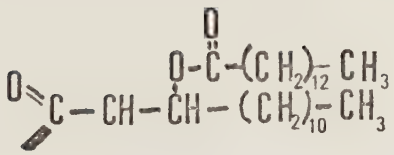
Bien que le lipide A de Bordetella pertussis diffère de celui des Salmonelles par la nature et les proportions relatives de ses acides gras, nous pouvions nous demander si ce lipide était constitué d'un squelette identique à celui d'autres bactéries à gram négatif. En effet, nous avons vu que les lipides des endotoxines ont un grand nombre d'activités biologiques en commun, il était donc important de savoir dans quelle mesure ces activités biologiques étaient conférées par une structure identique.

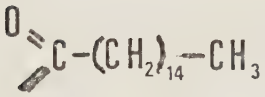
1 - Relation entre la libération de glucosamine réductrice et la libération de phosphore inorganique lors d'une hydrolyse acide douce du lipide A.

HASE et coll. (25) ont montré chez les Salmonelles R, l'existence des dimères de glucosamine reliés par des ponts pyrophosphate de la manière suivante : après un traitement du lipopolysaccharide par une hydrolyse alcaline douce

STRUCTURE D'UNE UNITÉ DU LIPIDE A DE SALMONELLE







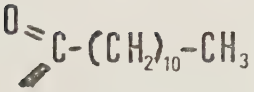
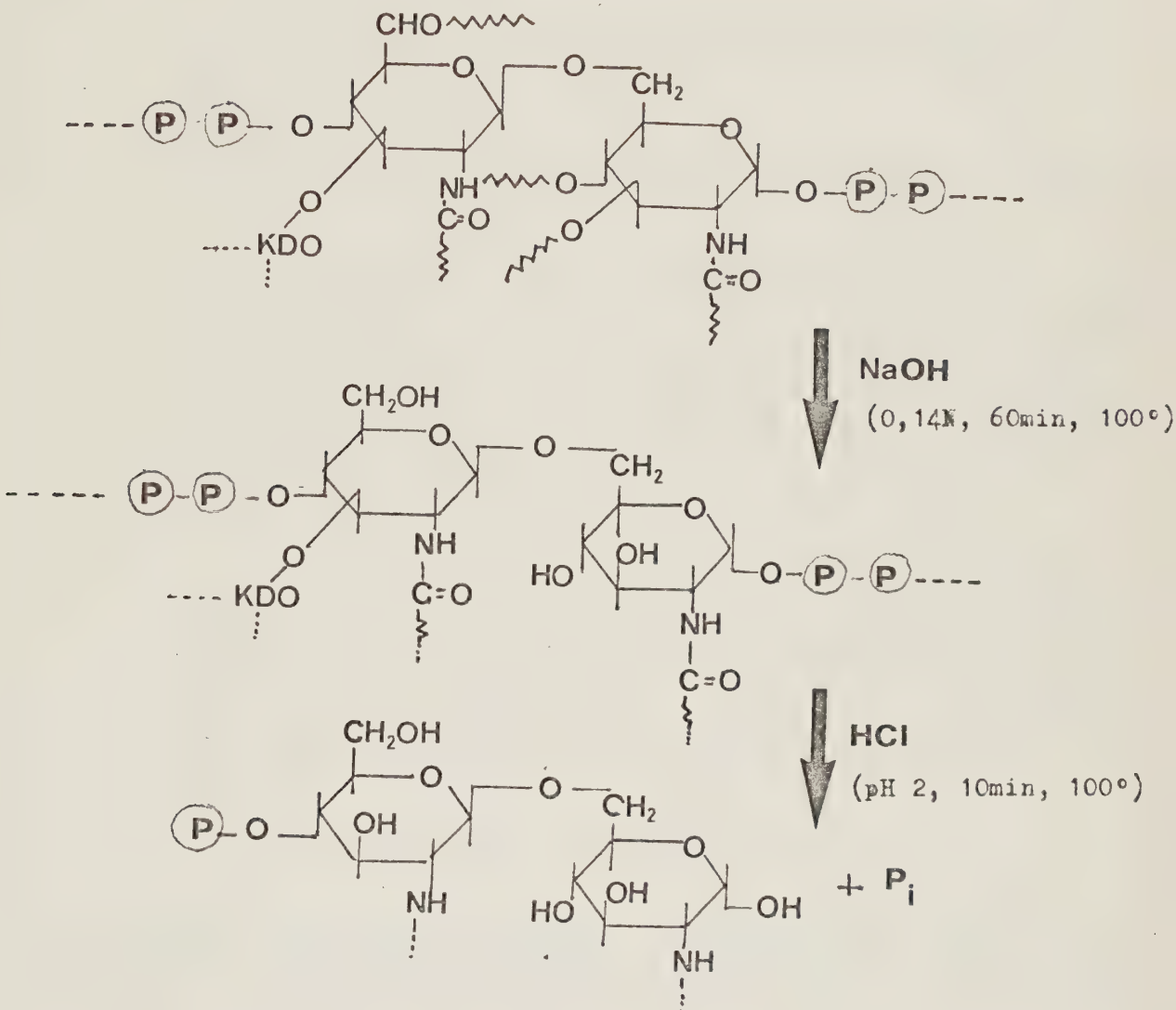


Figure 30

(NaOH 0,14 N, 60 mn à 100°C), on trouve que le rapport glucosamine-phosphore est égal à 1. Ce lipopolysaccharide traité par la soude est ensuite soumis à une hydrolyse acide (HCl pH 2, 10 mn à 100°C). Après cette hydrolyse acide, on note la libération de la moitié du phosphore et qu'une glucosamine sur deux est devenue réductrice ; le rapport de glucosamine/phosphore devient alors : deux glucosamines pour un phosphore. HASE propose donc le schéma suivant :



Ainsi, nous pouvions penser que si le lipide A de B-pertussis a une structure analogue à celle postulée par HASE, une hydrolyse acide douce (HCl 0,25 N à 100°C) du lipide A libèrerait la moitié du phosphore présent sous forme de phosphate inorganique, et que, parallèlement, nous devrions observer la libération de glucosamine réductrice.

Nous avons d'abord suivi la cinétique de libération du phosphate au cours d'une hydrolyse du lipide A par HCl 0,25 N à 100°C. Les résultats (fig. 31) indiquent qu'au bout d'une heure, nous atteignions un palier, ce palier correspondant à la libération de 24 % du phosphore total du lipide A. Nous pouvions penser que le fait de ne pas avoir soumis le lipide à une hydrolyse alcaline - afin de libérer les acides gras engagés dans une liaison ester avant le traitement acide - pouvait influencer la libération du phosphate au cours de l'hydrolyse du lipide A par HCl 0,25 N à 100°C.

Nous avons donc refait la même cinétique mais sur le lipide ayant subi une hydroxylaminolyse. Cette fois, nous avons atteint un palier correspondant à la libération de 32 % du phosphore total. (Fig. 31).

Nous avons alors cherché si cette libération de phosphore coïncidait avec l'apparition de glucosamine réductrice.

Nous avons procédé de la manière suivante : des échantillons de 232 µg de lipide A ont été hydrolysés par HCl 0,25 N à 100°C durant des temps variant de 0 à 60 minutes. Tous les échantillons ont été évaporés à sec puis repris par du toluène afin d'éliminer toute trace d'acide et réduits par du borohydrure de sodium (0,5 ml de $NaBH_4$ à 1 mg/ml). Le borohydrure de sodium en excès a été détruit par de l'acide chlorydrique, puis tous les échantillons ont été soumis à une hydrolyse par HCl 4 N, 8h à 100°C. Sur tous les échantillons, on dose la glucosamine par le dosage d'ELSON-MORGAN (p. 7).

Ainsi, toute molécule de glucosamine devenue réductrice au cours de l'hydrolyse par HCl 0,25 N a été transformée en glucosaminitol, un composé qui ne répond pas au dosage d'ELSON MORGAN. Il s'en suit que si la libération du phosphate était en relation comme dans le cas des Salmonelles avec la libération de glucosamines réductrices, nous devions noter au cours de l'hydrolyse par HCl 0,25 N à 100°C une diminution de la réponse à la réaction d'ELSON-MORGAN.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

temps d'hydrolyse (HCl 0,25 N)	réduction par $NaBH_4$	hydrolyse par HCl 4 N	réponse (D.O) à l'Elson-Morgan	% de glucosamine
0 min.	+	+	0,78	12,75
10	+	+	0,71	11,6
60	+	+	0,8	12,9
—	—	+	0,79	12,8

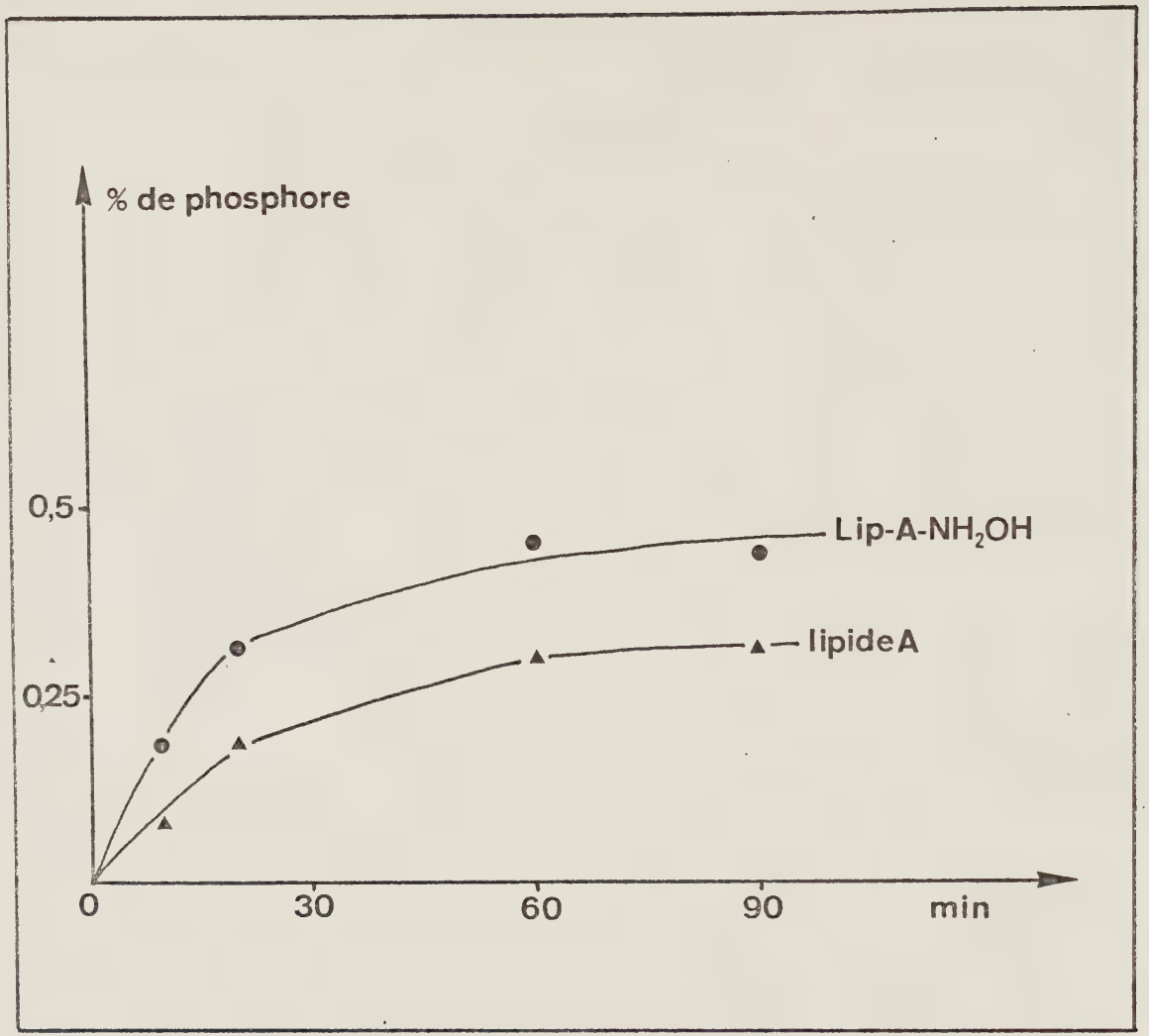


FIGURE 31 : CINETIQUE DE LA LIBERATION DU PHOSPHORE AU COURS D'UNE HYDROLYSE PAR HCl 0,25 N A 100°C DU LIPIDE A ET DU LIPIDE A HYDROXYLAMINOLISE (Lip-A-NH_2OH).

Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de libération de glucosamine réductrice au cours de ce traitement acide, alors que ce même traitement libère 24 % du phosphore total.

Afin de vérifier si ces résultats ne sont pas dus à un artefact manipulatoire, nous avons comparé la libération de la glucosamine réductrice au cours de l'hydrolyse HCl 0,25 N à 100°C, 1h, du Lipid-A de Salmonella typhi (I) et du lipide A de B. pertussis (Lip-A-BP).

(I) 27 mg de lipopolysaccharide de Salmonella typhi-murium (MJ) sont hydrolysés par de l'acide acétique pH 3,4 pendant 1h à 100°C, afin de cliver la liaison cétosidique du KDO libérant le Lipid-A du polysaccharide. Après une centrifugation à 3000 rpm, le culot est lavé et séché. Après lyophilisation, nous avons obtenu 13,7 mg de Lipid-A de Salmonelle (Lip-A-SA).

Nous avons schématisé le mode opératoire et les résultats dans le tableau suivant :

	Lip-A-SA		Lip-A-BP	
	1mg	1,7mg	1,16mg	1,16mg
hydrolyse HCl 0,25N	-	+	-	+
réduction par $NaBH_4$	-	+	-	+
HCl 4N, 8h à 100°	+	+	+	+
% de glucosamine	28	19,5	15,9	16,2
perte de glucosamine	30,3 %		0 %	

Ces résultats confirment qu'il n'y a pas de libération de glucosamine réductrice dans le cas du lipide de B. pertussis au cours d'une hydrolyse acide douce alors qu'il y a une libération de phosphore au cours de cette même hydrolyse.

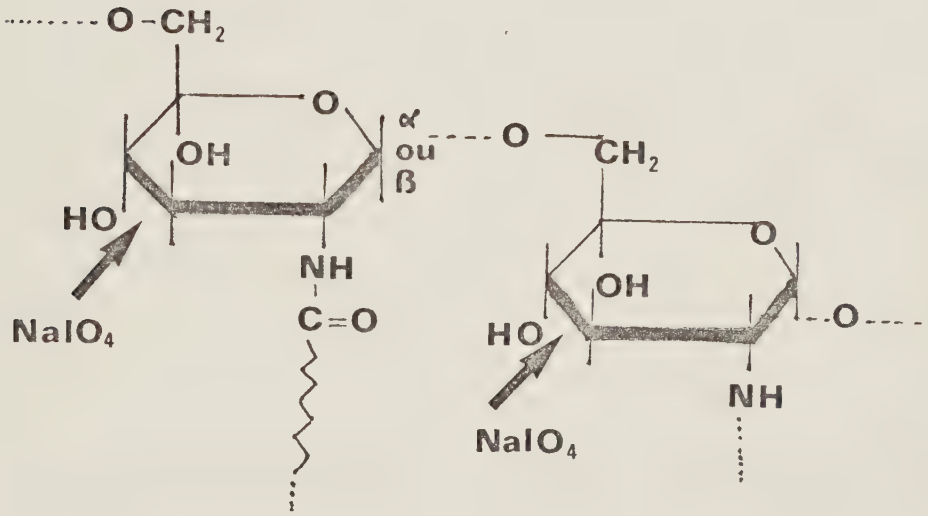
Ces résultats sont une première indication en faveur d'une structure différente pour le lipide A de B. pertussis par rapport à celui des Salmonelles.

2 - Traitement du lipide par l'hydroxylamine

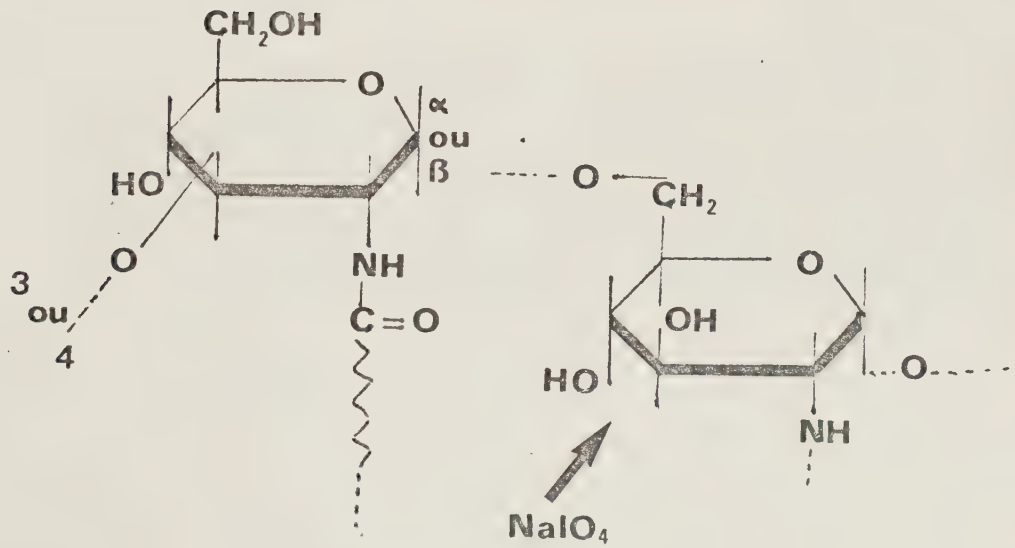
a) Action du périodate sur le lipide hydroxylaminolysé :

Nous avons montré précédemment qu'une hydroxylaminolyse libère environ 50 % des acides gras du lipide A. Au cours de ce traitement, il peut y avoir apparition de groupements hydroxyles vicinaux sur les molécules de glucosamine les rendant susceptibles au clivage par le périodate.

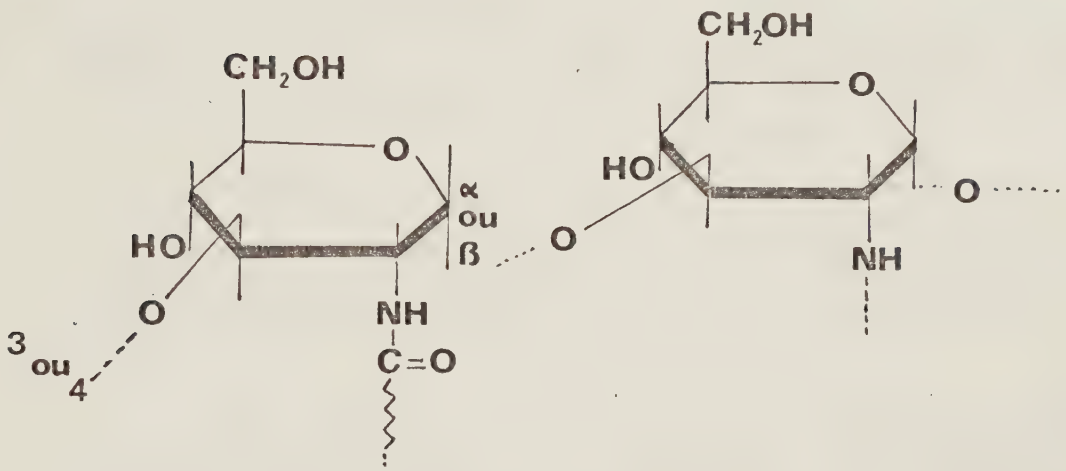
Suivant le mode de liaison des glucosamines entre elles dans la macromolécule, celles-ci pourront ou non être détruites par le périodate. Ainsi, si les glucosamines du squelette lipidique sont liées par des liaisons β ou α 1→6, toutes les glucosamines du Lip-A-NH_2OH seront détruites par le périodate et la réponse au dosage d'ELSON-MORGAN sera nulle:



Par contre, si les glucosamines sont liées successivement par des liaisons 1→6 et 1→4 ou 3, nous aurons une glucosamine sur deux qui sera détruite par le périodate. L'ELSON-MORGAN sera alors égal à 50 % de la teneur totale en glucosamine du lipide A :



Enfin, si toutes les glucosamines sont liées par des liaisons 1→4 ou 1→3, il n'y aura pas de destruction de glucosamine au cours du traitement périodique. La réponse de l'ELSON-MORGAN sera alors égale à la valeur totale des glucosamines du lipide A :



Afin de déterminer si l'enchaînement des glucosamines du lipide de B. pertussis répondait à l'un des trois schémas que nous avons proposés, nous avons suivi le protocole suivant : 1 mg de Lip-A-NH_2OH et 0,97 mg de lipide A sont traités séparément pendant 35 mn par une solution de périodate (0,5 ml 10^{-2} M). On rajoute ensuite 50 µl d'une solution d'éthylène glycool 10^{-1} M) afin de consommer l'excès de périodate puis les deux échantillons sont laissés à la température ambiante pendant 20 mn. Après une hydrolyse par HCl 4 N, 6h à 100°C, la glucosamine est dosée selon l'ELSON-MORGAN.

Pour le lipide A, nous avons obtenu une valeur de 12% de glucosamine, cette valeur représente en fait la teneur totale en glucosamine du lipide, alors que le Lip-A-NH_2OH ne contient que 7,3 % de glucosamine, ce qui représente 58 % de la glucosamine totale.

Il reste donc après traitement par le périodate du lipide hydroxylaminolysé une glucosamine sur deux. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'une glucosamine sur deux est encore substituée après le traitement par l'hydroxylamine, en position 3 ou 4 et que celle qui a été détruite était substituée en 6.Le modèle le plus probable serait comme chez les Salmonelles, un enchaînement successif de liaison 1→6 et 1→4 ou 3.

b) Détermination approximative du poids moléculaire du Lip-A-NH_2OH :

Contrairement au lipide A, le Lip-A-NH_2OH est soluble dans l'eau. Nous avons alors pensé qu'il nous serait possible d'avoir quelques précisions sur l'homogénéité de cette fraction et un poids moléculaire approximatif du Lip-A-NH_2OH par passage de ce dernier sur des colonnes de gels classiques.

SHAND et GRAHAM (41) ont montré que par ultracentrifugation, les poids moléculaires des endotoxines étaient très élevés, de l'ordre de 1 million. D'autres auteurs (40) postulent des poids moléculaires encore plus élevés d'environ $20\ 10^6$ pour le lipopolysaccharide de E. coli.

Cependant, pour le Lipid-A des Salmonelles, WESTPHAL (52) postule que ce lipide aurait un poids moléculaire de l'ordre de 2 000. Ceci laisserait supposer que le Lipid-A des Salmonelles serait constitué de dimère ou d'un tétramère de glucosamine phosphate dont les groupements hydroxyles et amines seraient substitués par des acides gras.

Dans le cas de B. pertussis, nous n'avions pas d'ordre de grandeur pour les poids moléculaires ni de l'endotoxine, ni de son lipide. Ainsi, nous avons choisi de chromatographier le Lip-A-NH_2OH sur une colonne d'ULTROGEL AcA 44 (voir méthodes analytiques p. 10). Le Lip-A-NA_2OH, comme le lipopolysaccharide étaient exclus sur ce gel (fig. 32). Nous avons alors choisi un gel (BIOGEL A-50 m) dont la limite d'exclusion était supérieure ($50\ 10^6$). Le lipide était encore exclu. Il devenait alors évident que le Lip-A-NH_2OH devait former des micelles ou des agrégats ne nous permettant pas, par des méthodes de chromatographie sur gel, d'obtenir un poids moléculaire, même très approximatif.

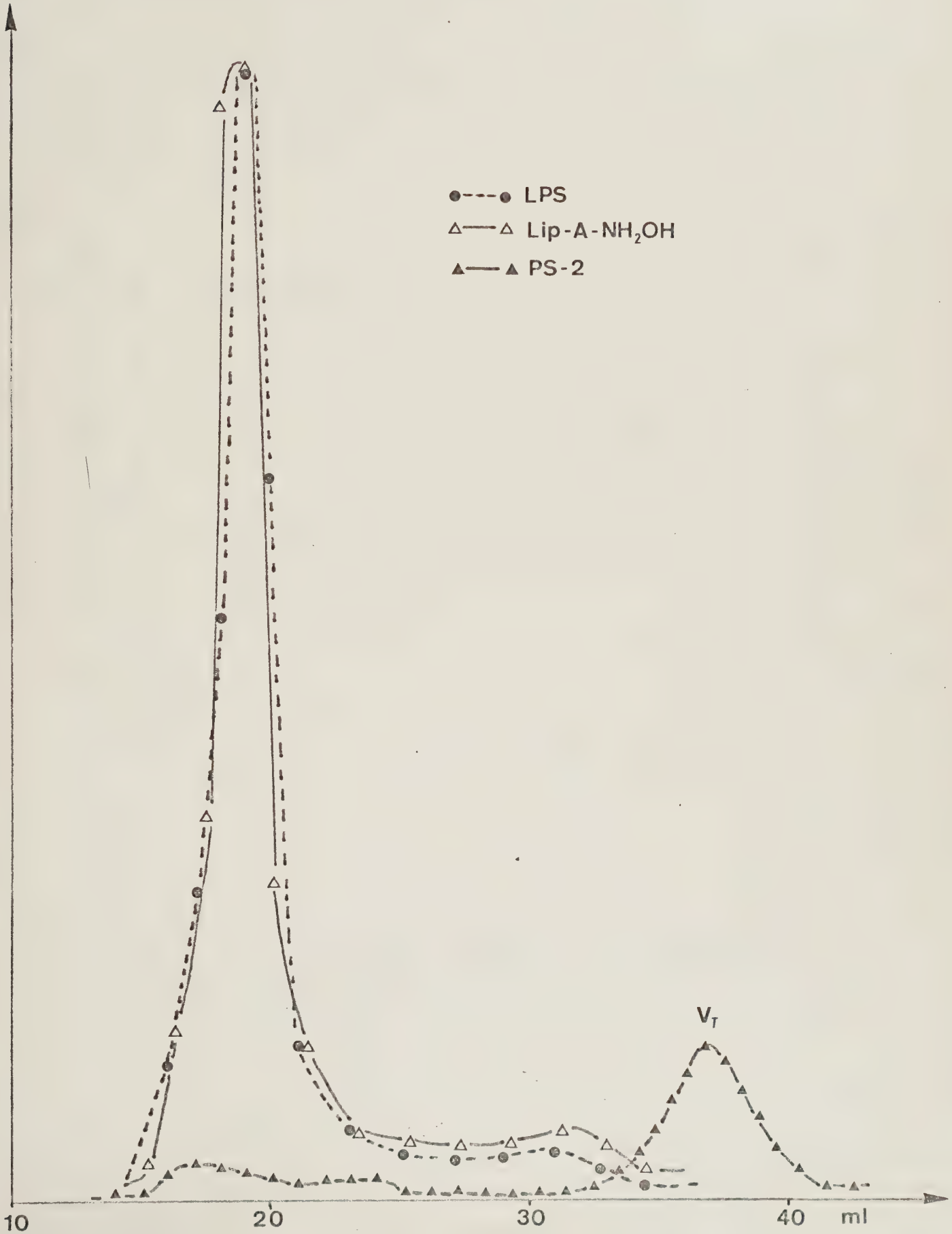
3 - Etude de la cinétique de libération de la glucosamine au cours d'une hydrolyse acide du Lipide A2

Afin d'étudier la structure du lipide A, il nous fallait trouver une hydrolyse capable de cliver la macromolécule lipidique en fragments assez petits de taille, sans pour autant le dégrader complètement.

Dans ce dessein, nous avons suivi la réponse du lipide A à la réaction d'ELSON-MORGAN au cours d'une hydrolyse acide par HCl 4 N et N à 100°C. En fonction du temps, cette réaction réflète le clivage de la liaison osidique et la libération du substituant du groupement aminé de la glucosamine. En effet, la glucosamine ne répond au dosage d'ELSON-MORGAN que si ses groupements réducteurs et amine sont libres.

Des échantillons de 50, 50, 60, 80 et 100µl d'une solution de lipide A à 5,8 mg/ml ont été hydrolysés par HCl N à 100°C respectivement pendant 10, 7, 5, 4 et 2 heures.

FIGURE 32 : DETERMINATION APPROXIMATIVE DU POIDS MOLECULAIRE DU Lip-A-NH_2OH. PASSAGE SUR UNE COLONNE D'ULTROGEL AcA 44 DU Lip-A-NH_2OH PUIS D'UN MELANGE LPS + PS-2.



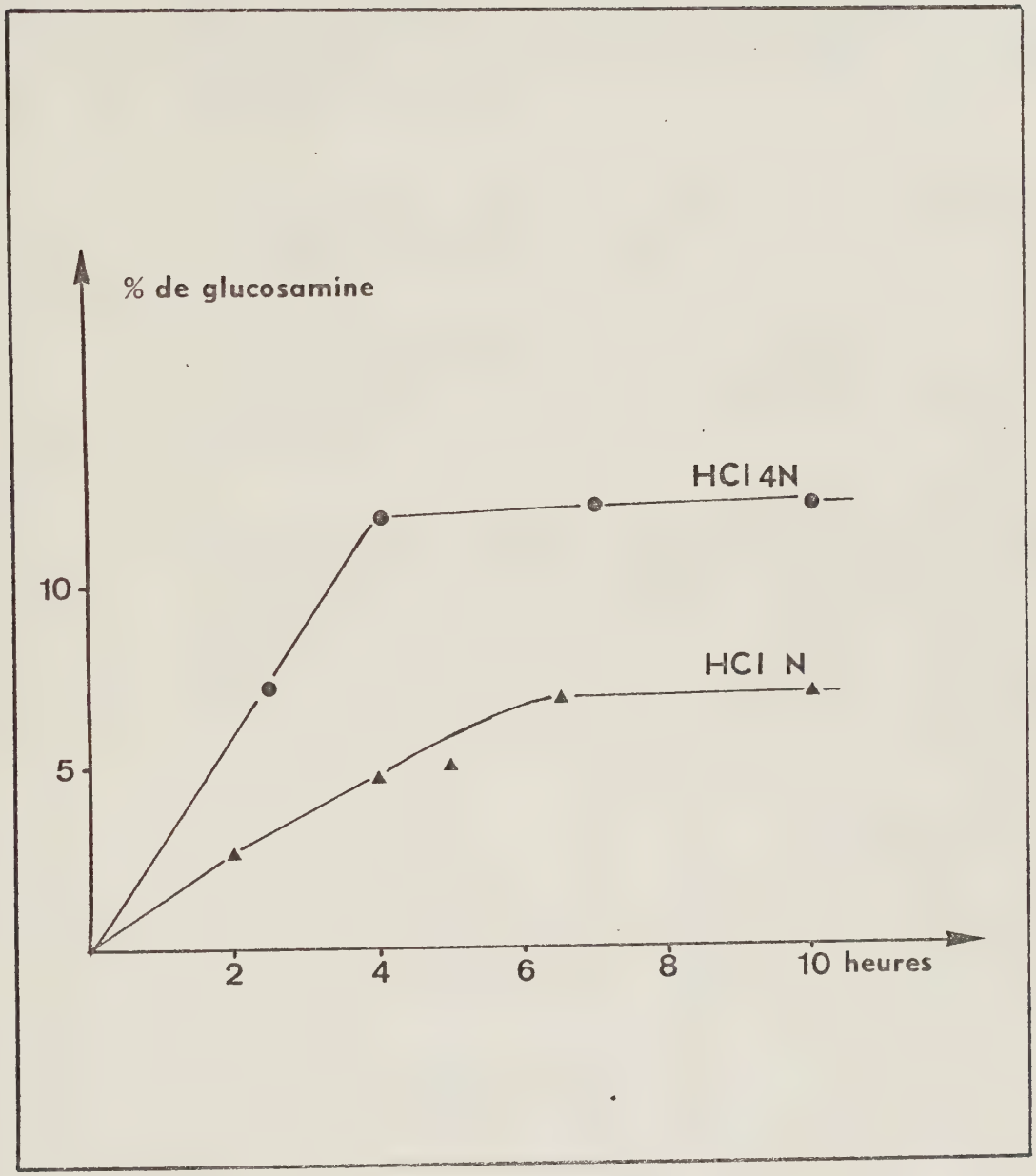


FIGURE 33: REPONSE DU LIPIDE A AU DOSAGE D'ELSON-MORGAN, AU COURS D'UNE HYDROLYSE ACIDE PAR HCl N ET 4N A 100°C.

De même, des échantillons de 20µl ont été hydrolysés par HCl 4 N à 100°C pendant 2, 4, 7 et 10 heures. Le dosage de la glucosamine a donné les résultats rassemblés sur la figure 33. On voit que l'on obtient un palier de libération de la glucosamine par HCl 4 N à 100°C au bout de 4 h. Au palier, la valeur obtenue représente la quantité totale de glucosamine contenue dans le lipide A. Par contre, l'hydrolyse par HCl N atteint un palier après 7 h d'hydrolyse, et la valeur obtenue à ce palier ne représente que 58 % de la glucosamine totale. Nous pouvions donc espérer qu'une telle hydrolyse nous permettrait d'isoler des petits fragments dont la structure serait plus facilement analysable.

4 - Etudes des fragments du lipide A formés par une hydrolyse acide (HCl N, 5 h à 100°C).

a) Etude de l'hydrolysat par électrophorèse :

L'hydrolysat du lipide A par HCl N, 5 h à 100°C est centrifugé puis soumis à une électrophorèse à pH 7,2 pendant deux heures (4 000 V/90 cm).

Sur l'électrophérogramme (fig. 34), on révèle par le réactif à la ninhydrine-collidine essentiellement quatre taches. Les quatre taches ont été éluées après une électrophorèse préparative de l'hydrolysat obtenu à partir de 10 mg de lipide A. Nous avons alors dosé sur chaque éluat le phosphore, l'azote, la glucosamine totale et la glucosamine restant après réduction. Les résultats obtenus, portés sur le tableau ci-dessous, sont exprimés en µ équivalents :

tache	P	N	glucosamine	glucosamine après $NaBH_4$
1	0,51	0,4	0,29	0,14
2	0,08	0,27	0,1	0,06
3	1	0,9	0	0
4	0	1,1	1,1	0,1

La substance correspondant à la tache n° 4 qui migre comme la glucosamine, contient 1 µeq d'azote pour 1 µeq d'hexosamine et pas de phosphore; après réduction, ce produit ne répond plus au dosage d'ELSON-MORGAN. Il s'agit donc de glucosamine libre.

La substance correspondant à la tache n° 3 contient 1µ eq d'azote pour 1µ eq de phosphore, ne répond pas au dosage d'ELSON-MORGAN et migre en électrophorèse et en chro-

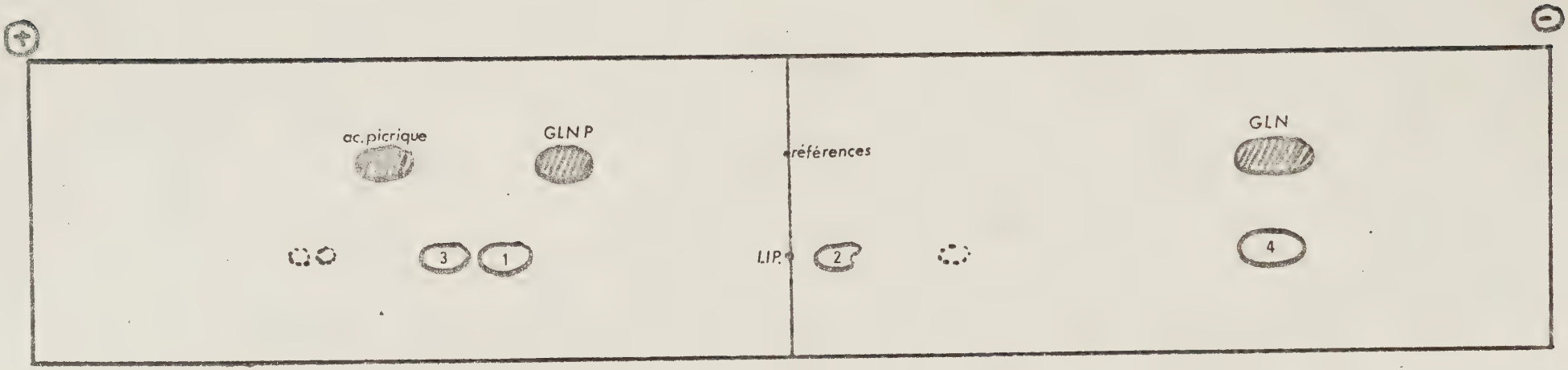


FIGURE 34 : Eléctrophorèse pH 7,2 (4000 V) 2 heures

du Lipide hydrolysé par HCl N 5 heures à 100°C _ Références : Glucosamine (GLN) et

Glucosamine.6.phosphate (GLNP)

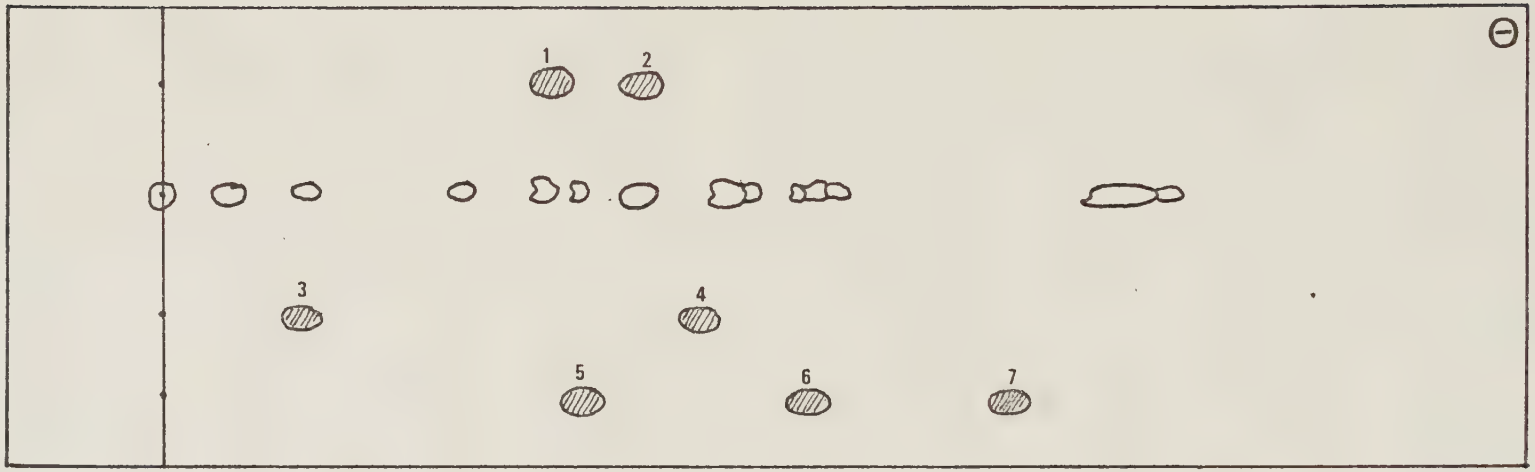


Figure 35: Electrophorèse à pH 1,9 (4000V, 1h) de la tache n°2 (obtenue après électrophorèse à pH 7,2 du lipide A2 ayant subit une hydrolyse par HCl N, 5h à 100°C.) hydrolysée par HCl 6N, 15h à 100°C.

Références: (1) acide aspartique (2) sérine (3) glucosamine-phosphate, (4) glucosamine (5) acide glutamique (6) glycine (7) alanine.

matographie sur papier (solvant A) comme l'éthanolamine-phosphate. Cet ester est un contaminant du lipide A, car il est absent du lipide A2. Nous avons déjà dit que le PS-2 contient de l'éthanolamine-phosphate, nous savons que le lipide A est contaminé par une faible quantité de PS-2 et de glycolipide (GLP-C). Ces contaminants se retrouvent dans les fractions R-MeOH et E-MeOH (fig. 11 p.31).

Le produit correspondant à la tache n° 2 contient plus de µeq d'azote que de µeq de glucosamine. Cette fraction contient donc un produit azoté autre que la glucosamine. Une partie de cette fraction a été hydrolysée par HCl 6 N, 15 h à 100°C et a été soumise à une électrophorèse à pH 1,9 pendant 1 h (4 000 V / 90 cm). Nous voyons sur l'électrophérogramme que ce produit (n°2) est constitué d'acides aminés, d'une faible quantité de glucosamine et glucosamine phosphate (fig. 35). Ces résultats sembleraient confirmer la présence d'un peptide dans le lipide.

La substance correspondant à la tache n°1 s'est avérée, après chromatographie sur papier (solvant A) contaminée par de l'éthanolamine-phosphate. Après purification, nous obtenons 0,68 µeq de phosphore pour 0,605 µeq de glucosamine. Comme ce produit migrait différemment de la glucosamine phosphate aussi bien en électrophorèse qu'en chromatographie sur papier (solvant A), nous avons pensé qu'il s'agissait d'un petit fragment du lipide A, constitué d'un dimère ou d'un trimère de glucosamine phosphate.

L'obtention de ce produit était assez longue et ne nous permettait d'isoler que très peu de substance ; aussi, nous avons pensé l'obtenir en plus grande quantité après passage de l'hydrolysat du lipide A (HCl N, 5 h à 100°C) sur une résine DOWEX G 50 (H+).

b) Etude de l'hydrolysat après passage sur DOWEX G 50 :

220 mg de lipide A ont été hydrolysés par 100 ml d'HCl N, pendant 5 h à 100°C (bain d'huile, agitation magnétique).

L'hydrolysat a été centrifugé 30 mn à 3 000 rpm. Le surnageant amené à sec est séché dans un dessicateur sur potasse. Le culot a été lavé jusqu'à pH neutre puis lyophilisé (150 mg).

- le surnageant

Le résidu du surnageant a été dissous dans 1 ml d'eau, sur un aliquot, nous avons fait des dosages de phosphore et d'ELSON-MORGAN. Puis, nous avons déposé le reste sur une colonne de résine DOWEX G 50 (voir p.11). La colonne fut éluée successivement par 50 ml d'eau, 100 ml d'HCl 0,1 N et 100 ml d'HCl 0,3 N. Nous avons recueilli des fractions de 5 ml.

Sur toutes les fractions, nous avons dosé :

- le phosphore total (après minéralisation)
- le phosphore inorganique
- la glucosamine totale (après HCl 4 N, 6 h à 100°C)
- la glucosamine répondant directement au dosage (sans hydrolyse HCl 4 N)

Le chromatogramme obtenu (fig. 36) après dosage du phosphore indique que le surnageant se répartit en 5 pics (A, B, C, D et E). Par contre, après dosage des hexosamines, nous n'en obtenons que 4 (I, II, III et IV) (fig. 37).

Deux de ces pics ne contenaient que du phosphore : le pic A qui correspondait à du phosphore inorganique car le rapport phosphore total/phosphore inorganique était égal à 1 et le pic E qui correspondait à de l'éthanolamine-phosphate.

Un pic répondait uniquement à l'ELSON-MORGAN, le pic IV dont le rapport glucosamine totale/gulcosamine directe = 1 correspondait à de la glucosamine libre.

En fin, trois pics contenaient à la fois du phosphore et de la glucosamine, nous les avons appelés fractions I-B, II-C et III-D (fig. 38)

La fraction I-B a un rapport glucosamine totale/glucosamine directe = 2,6 et un rapport phosphore/glucosamine totale = 0,55. Il y aurait donc dans cette fraction 1 équivalent de phosphore pour 2 molécules de glucosamine. Cependant, comme cette fraction est éluée par de l'eau, il faut supposer qu'une glucosamine sur deux a son groupement aminé bloqué.

Le rapport de glucosamine totale/glucosamine directe nous indique qu'il existe dans cette fraction des molécules de glucosamine encore substituées. Mais, il faut noter que ce rapport ne peut pas nous donner le nombre exact de glucosamines liées entre elles car, dans ce dosage, si la glucosamine est substituée en position 6, elle répond plus faiblement que ne le fait la glucosamine libre et si elle est substituée en position 3 ou 4, elle répond encore moins bien (11, 20). Ce rapport paraît donc indiquer qu'il existe dans cette fraction I-B, probablement un disaccharide de glucosamine (le rapport de 2,6 résulte d'une surestimation à cause de la valeur trop faible que l'on obtient par le dosage de "glucosamine directe").

La fraction II-C a un rapport glucosamine totale/glucosamine directe = 3,04 et un rapport de phosphore/glucosamine totale = 0,74. Ces rapports indiquent qu'il s'agit de trois phosphores pour quatre glucosamine et qu'il existe dans cette fraction des glucosamines encore substituées.

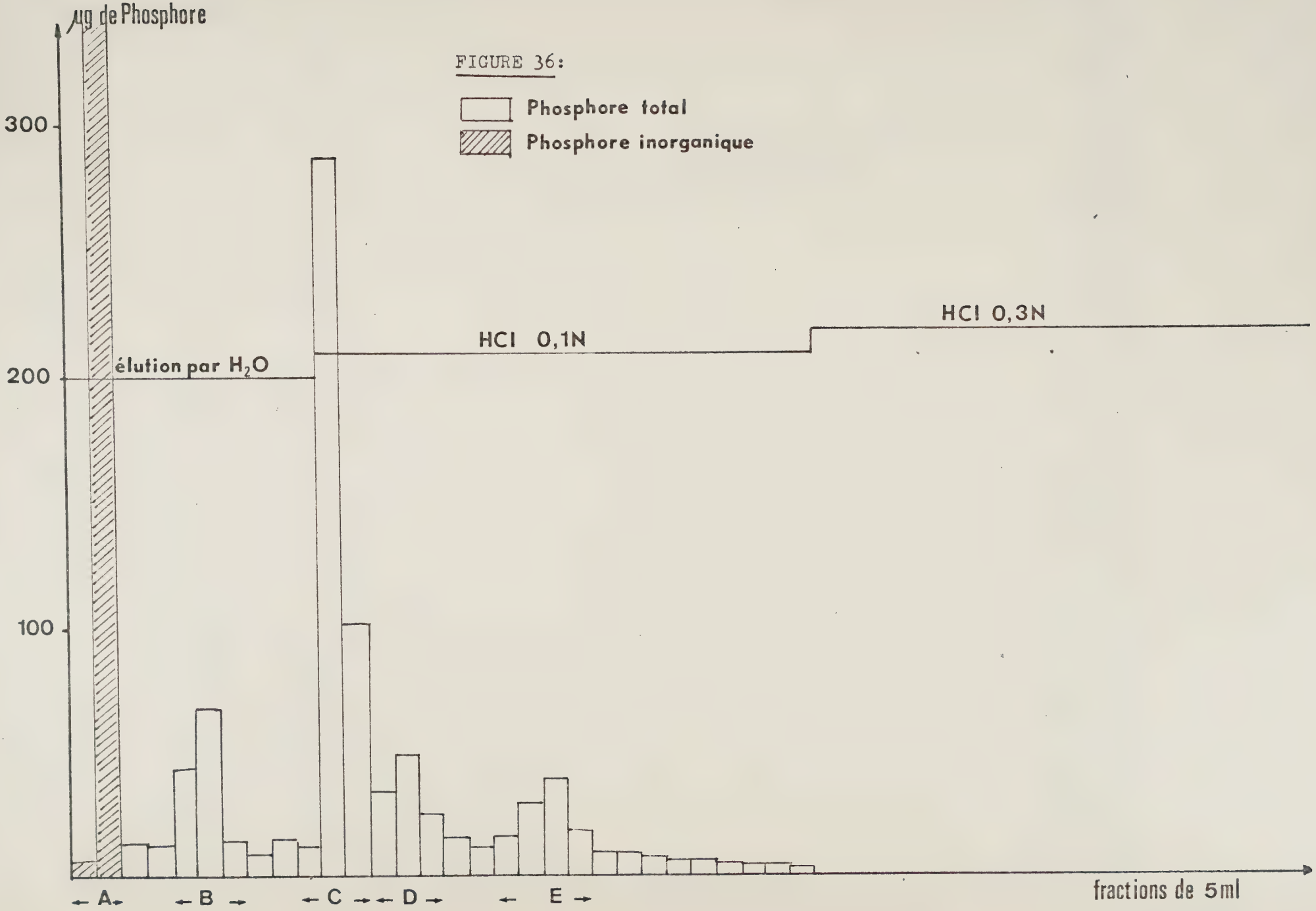

µg de Phosphore
300
200
100
Phosphore total
Phosphore inorganique
élution par H_2O
HCl 0,1N
HCl 0,3N
A
B
C
D
E
fractions de 5ml

FIGURE 36:

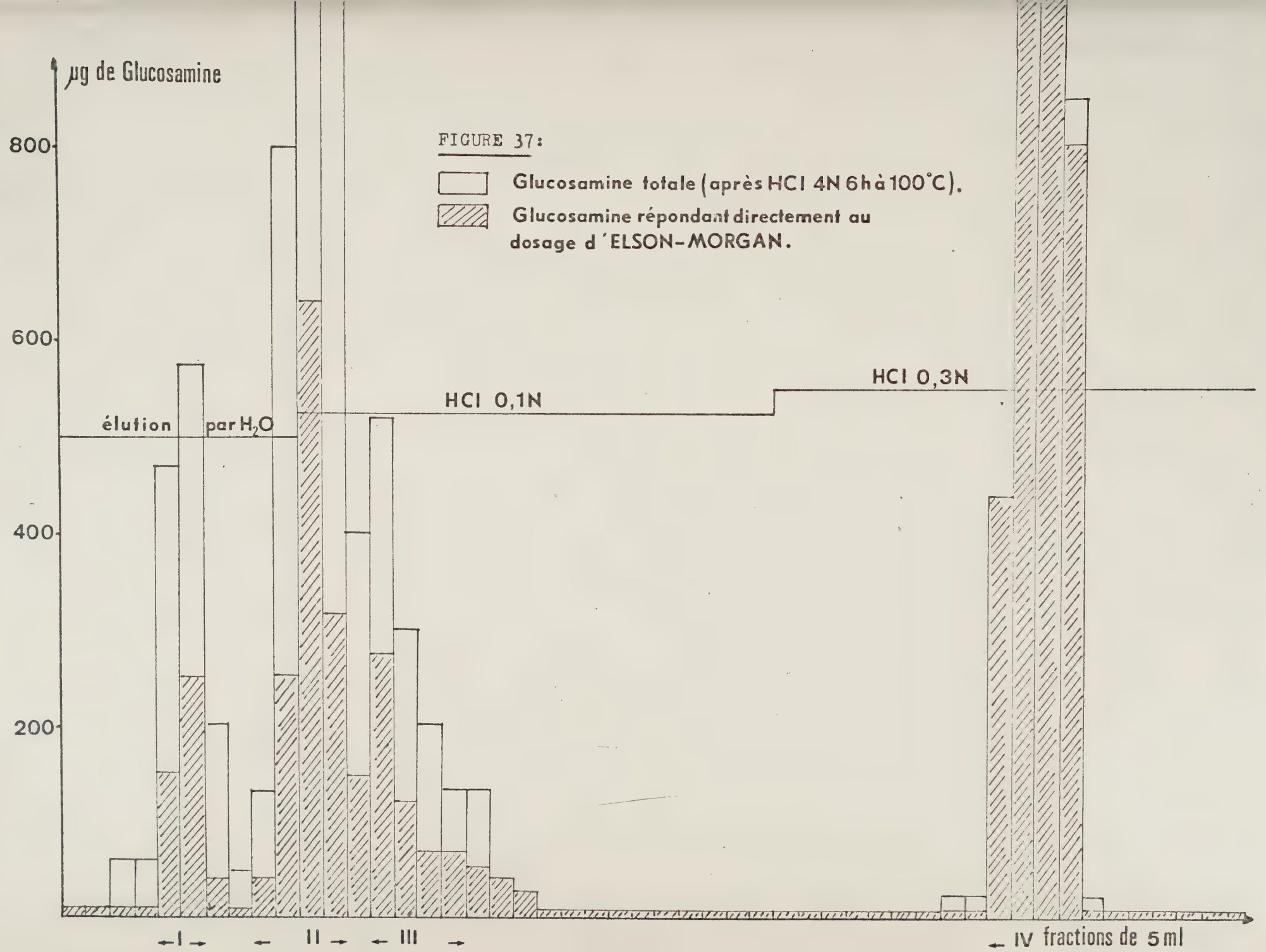
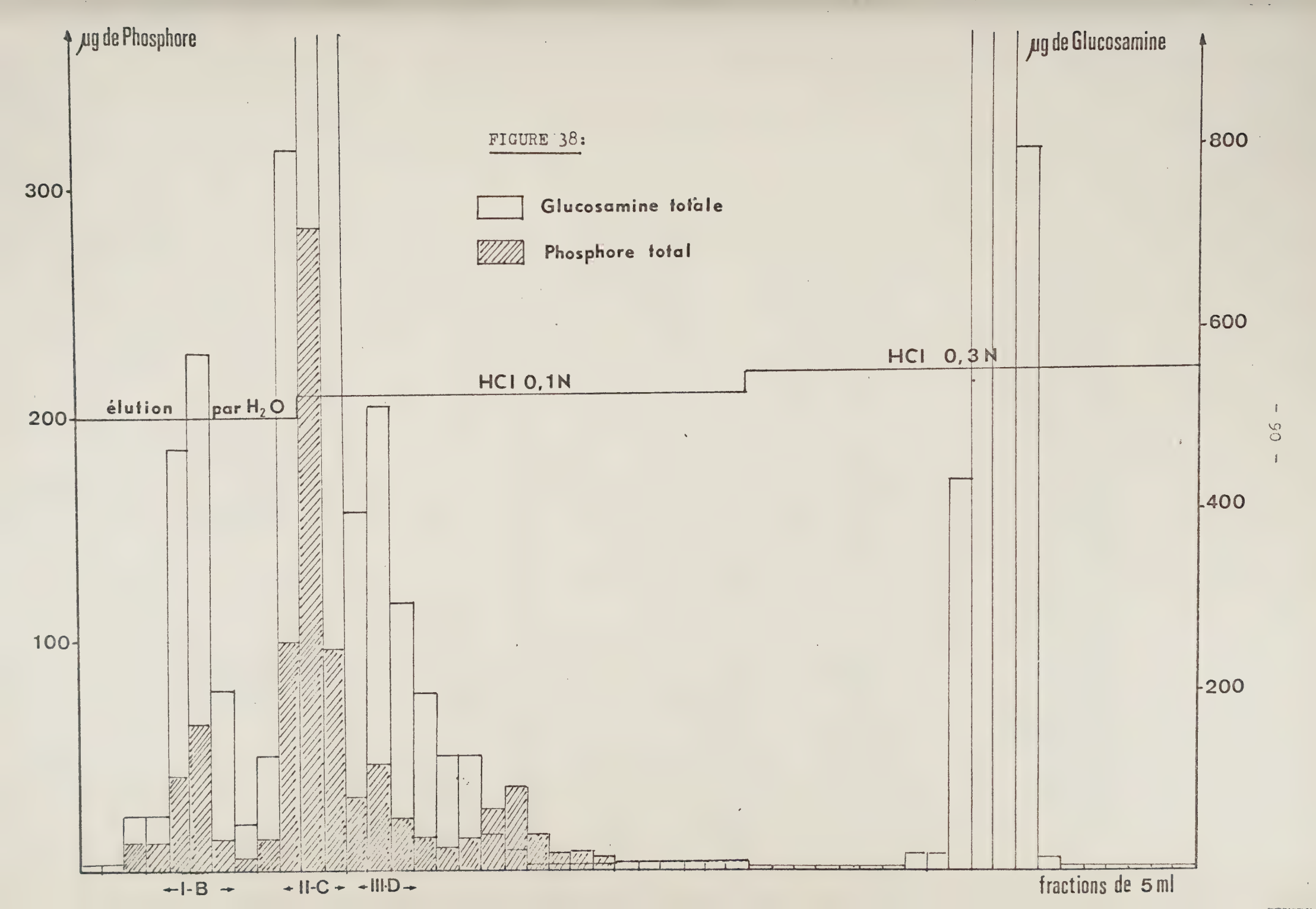


FIGURE 37:

Glucosamine totale (après HCl 4N 6h à 100°C).

Glucosamine répondant directement au dosage d'ELSON-MORGAN.


µg de Phosphore
µg de Glucosamine
FIGURE 38:
Glucosamine totale
Phosphore total
300
200
100
800
600
400
200
élution par H_2O
HCl 0,1N
HCl 0,3N
I-B
II-C
III-D
fractions de 5 ml

La fraction III-D donne des valeurs très proches de ceux de la fraction I-B. Ces rapports étant de 3 pour les glucosamines et de 0,47 pour le phosphore/ glucosamine totale. Cependant, si cette fois, nous avons également un disaccharide de glucosamine dont une phosphorylée, les groupement aminés de ces dernières sont libres.

La fraction E correspond à de l'éthanolamine-phosphate.

- le culot (150 mg)

Afin d'éliminer les acides gras libérés par l'hydrolyse acide (HCl N, 5 h à 100°C) du lipide A, qui devaient se trouver dans le culot, nous avons extrait ce dernier par de l'hexane. 118 mg du culot sont solubles dans l'hexane et 23,5 mg insolubles. Nous avons dosé sur ces deux fractions le phospore total, les acides gras et les hexosamines, et trouvé les résultats donnés ci-dessous :

	% P	% glucosamine	% acides gras libres	% acides gras totaux
soluble dans l'hexane	1,3	8,6	80	90
insoluble	2	15	n.d	76

L'ensemble de ces expériences sur l'hydrolysat du lipide A par HCl N, 5 h à 100°C donne les résultats suivants :

		P (µg)	glucosamine totale (µg)	acides gras (mg)
Lipide A de départ		4092	28 600	134
Surnageant 3000 rpm		1520 _A 630 _B 108 _C 488 _D 74 _E 80	15 000 _I 1050 _II 3700 _III 1000 _IV 7760	n.d
Culot	soluble dans l'hexane	1580	10600	106
	insoluble	513	3540	18

Ces résultats indiquent que cette hydrolyse libère 15 % du phosphore sous forme de phosphore inorganique et 27 % de glucosamine libre. Ces résultats sont incompatibles avec une structure comme celle proposée pour le Lipid-A des Salmonelles.

De plus, cette hydrolyse est insuffisante car la moitié de la glucosamine contenue dans l'échantillon est restée dans le culot 3 000 rpm, c'est-à-dire, qu'une partie du squelette lipidique n'est pas hydrolysable par la méthode que nous avons employée. Par contre, si nous regardons la distribution de la glucosamine dans les différentes fractions du surnageant, nous constatons que la majorité de celle-ci se trouve dans la fraction IV, c'est-à-dire sous forme libre. Nous obtenons donc peu de petits fragments de lipide, ce qui conduit à penser que l'hydrolyse a été trop forte. Il semble donc que pour étudier la structure du lipide de B. pertussis, il faille trouver d'autres méthodes d'analyses que celles employées usuellement pour l'étude des Entérobactéries.

Il faudrait pouvoir utiliser une méthode à la fois moins drastique et plus spécifique. Une méthode faisant appel à des enzymes spécifiques, serait peut-être la plus appropriée.

CONCLUSION

Nous avons montré, au cours de ce travail, qu'il était possible d'isoler de l'endotoxine de Bordetella pertussis, deux fractions lipidiques.

Une hydrolyse acide très douce du lipopolysaccharide de B.pertussis permet d'obtenir une fraction, soluble dans le mélange toluène-méthanol, que nous avons appelé lipide X2. Cette même hydrolyse libère également un glycolipide (GLP-A) qui, soumis à un traitment acide doux, permet d'obtenir la deuxième fraction lipidique soluble également dans le mélange toluène-méthanol : le lipide A2.

Ces deux fractions possèdent toutes les caractéristiques que l'on attribue généralement aux "Lipid-A" des Entérobactéries. En effet, elles sont toutes deux constituées essentiellement d'acides gras, de glucosamines, de phosphate et d'une faible proportion d'acides aminés ; elles possèdent certaines des activités biologiques définissant les endotoxines.

Ces deux fractions se différencient par leur composition chimique et leurs activités biologiques.

En effet, nous avons montré que le lipide X2 avait une composition et des proportions relatives d'acides gras très différentes de celles du lipide A2. Il faut noter que nous avons montré que ce dernier, représentant la majorité de la macromolécule lipidique de l'endotoxine intacte de B.pertussis, n'a pas une structure analogue à celle des "Lipid-A" des Entérobactéries. Il est intéressant de remarquer que des macromolécules différentes exercent des activités biologiques identiques lorsqu'on les injecte à un hôte.

Quant aux activités biologiques, nous avons vu que le lipide X2 avait des propriétés toxiques, pyrogènes qu'il provoquait une réaction de Schwartzmann, conférait une immunité non spécifique à l'hôte et possédait un pouvoir adjuvant très élevé.

Il faut noter à ce sujet que FARTHING (17) avait déjà observé que les "Lipid-A" obtenus à partir d'Escherichia coli et de B.pertussis avaient un pouvoir adjuvant et que ces lipides étaient les seules fractions actives des endotoxines. Mais, contrairement à ce que nous observons pour le lipide X2, les Lipid-A isolés par FARTHING ne permettaient pas d'obtenir des taux d'anticorps aussi élevés qu'avec les endotoxines intactes, même à des doses importantes. Dans notre cas, la fraction X2 possède un pouvoir adjuvant supérieur à celui du lipopolysaccharide de départ.

Pour le lipide A2, nous avons observé qu'il n'était ni toxique, ni pyrogène ; il ne provoque pas la réaction Schwartzmann. Quant à l'immunité non spécifique, nous n'avons observé qu'une activité très faible alors que ce lipide représente un bon adjuvant.

Nous observons ici, comme d'autres auteurs (14-17), qu'il n'y a pas de parallélisme entre la toxicité et le pouvoir adjuvant. Ces deux propriétés des endotoxines ne sont sûrement pas portées par le même site dans la macromolécule lipidique. Il en est probablement de même pour l'établissement de l'état d'immunité non spécifique et le pouvoir adjuvant puisque nous isolons deux fractions différentes, l'une, conférant une immunité non spécifique et l'autre pas, alors que les deux ont un pouvoir adjuvant.

L'ensemble de ces résultats permet de répondre par l'affirmative aux deux questions que nous nous sommes posées : la macromolécule lipidique de l'endotoxine de B.pertussis possède, sans aucun doute, plusieurs sites responsables chacun, de certaines activités "endotoxiques".

De plus, cette macromolécule lipidique a une structure différente de celle des Lipid-A, des Entérobactéries.

REFERENCES

1 - ADAMS G.A.

Structural features of the Lipid-A preparation isolated from Escherichia coli and Shigella flexneri.
Biochem. Biophys. Acta., 202. 553-555 (1970)

2 - ADAMS G.A.PREM PAL SINGH

The chemical constitution of Lipid-A from Serratia marcenscens.
Canad. J. Biochem. 48. 55-62 (1970)

3 - APRILE M.A., WARLAW A.C.

Immunochemical studies on the lipopolysaccharide of Bordetella pertussis.
Can. J. Microbiol., 19. 231-239 (1973)

4 - BACH J.F.

Le complément dans Immunologie.
Edition Flammarion, Chap. 8 p. 210

5 - BAHAVANDAN V.P., BUDDECKE E., CARUBELLI R. et GOTTSHAK A.

The complete enzymic degradation of glycopeptides containing O-seryl and O-threonyl linked carbohydrate.
Biochem. Biophysic. Res. Commun., 16. 353-357 (1964)

6 - BORDET J.

Brux. Med., 16.503-505 (1936)

7 - BURTON A.J. et CARTER H.E.

Purification of the Lipid-A component of the Lipopolysaccharide from Escherichia coli.
Biochemistry, 3. 411-418 (1964)

8 - CHABY R.

Eléments structuraux de l'endotoxine de Bordetella pertussis.
Thèse (nov 1974) Orsay.

9 - CHARON D.

Synthèse, réactions et dosage d'acide 3-desoxy aldulosonique substitué (Orsay).
Thèse (avril 1974)

10 - CHEN P.S., TORRIBA T.Y. et WARNER H.

Microdetermination of Phosphorus.
Analytical Chemistry, 28, n° II. 1756-1758 (nov. 1956)

11 - CIFONELLI J.A., ORTNAN A.

A colorimetric method for determination of linkage in hexosamine containing compunds.
J. Biol. Chem, 231. 11-18 (1958)

12 - COLOBERT L., BRUN F., SERVANT P; et CREACH O.

Influence de la thymectomie chez le lapin nouveau-né sur les propriétés adjuvantes de l'immunité manifestées par l'endotoxine de Salmonella typhi et sa fraction lipidique.
Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 174 (1967)

13 - COSTERTON J.W.

Structure and Function of the Cell Envelope of Gram Negative Bacteria.
Bacteriol. Rev., 38. 87-109 (1974)

14 - CREACH O.

Contribution à l'étude des propriétés biologiques de lipides constitutifs de l'endotoxine d'Eberthella thyphi. (Faculté de pharmacie de Lyon).
Thèse (juin 1966)

15 - DRÖGE W., LEHMANN W., LUDERITZ O. et WESTPHAL O.

Structural Investigation on the 2-keto-3-deoxyoctonate Region of Lipopolysaccharide.
Eur. J. Biochem., 14. 175-184 (1970)

16 - DUBOIS M., AGILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F.

Coloric method for determination of sugars and related substances.
Analytical Chemistry, 28. n°3, 350-356 (mars 1956)

17 - FARTHING J.R.

The role of Bordetella pertussis as an adjuvant to antibody production.
Brit. J. Explt. Pathol., 42. 614-622 (1961)

18 - FARTHING J.R., et HOLT L.B.

Experiments designed to determine the mecanisme of the adjuvant activity of gram negativ organism upon antibody production.
J. Hyg., 60, 411-426 (1962)

19 - FENSOM A.H. et GRAY G.W.

The chemical composition of the Lipopolysaccharide of Pseudomas aeruginosa.
Biochem. J., 114. 185-196 (1969)

20 - FOSTER A.B., HORTON D. et STACEY M.

Amino sugars and related compounds. Part II. Observation on the acidic hydrolysis of derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucose.
J. Chem. Soc., 81-86 (1957)

21 - GALANOS C., RIETSCHEL E.Th., LUDERITZ O. et WESTPHAL O.

Interaction of Lipopolysaccharide and Lipid-A with Complement.
Eur. J. Biochem., 19. 143-152 (1971)

22 - GALANOS C., LUDERITZ O. et WESTPHAL O.

Preparation and Properties of Antisera against the Lipid-A Component fo Bacterial Lipopolysaccharides.
Eur. J. Biochem., 24. 116-122 (1971)

23 - GALANOS C.

Activité biologique du lipopolysaccharide et du Lipid-A. Thèse (02-7

24 - GALANOS C., RIETSCHEL E.Th. LUDERITZ O., WESTPHAL O.

Biological activities of Lipid-A complexed with Bovine-serum-albumine.
Eur. J. Biochem. 31. 230-233 (1972)

25 - HASE S., RIETSCHEL E.Th.

Isolation and Analysis of the Lipid-A Backbone.
Eur. J. Biochem., 63. 101-107 (1976)

26 - HOWARD J.G., ROWLEY D. et WARLAW A.C.

Stimulation of non specific Immunity by the Lipid-A Component of Bacterial Lipopolysaccharide.
Nature, 179. 314-315 (1957)

27 - HOWARD J.G., ROWLEY D., WARDLAW A.C.

Investigations on the mecanisme of stimulation of non specific immunity by bacterial lipopolysaccharides.
Immunology, 1. 181-203 (1958)

28 - KAZAI N., AOKT Y., WATANABE T., ODAKA T. et YAMAMOTO T.

Studies on the antitumor effect of the bacterial lipid component, lipid A.
JAP. J. Microbiol. 5. 347-366 (1961)

29 - LACAVE C., ASSELINEAU J., SERRE A. et ROUX J.

Comparaison de la composition chimique d'une fraction lipo-polysaccharidique et d'une fraction polysaccharidique isolées de Brucella melitensis.
Eur. J. Biochem., 9. 189-198 (1969)

30 - LAPORTE M.

Thèse Orsay (1976)

31 - LEDUR A.

Résultats non publiés.

32 - LUDERITZ O., GALANOS C., LEHMANN V., NURMINEN M., RIETSCHEL E.Th., ROSENFELDER G., SIMON M. et WESTPHAL O.

Lipid-A:Chemical Structure and Biological Activity.
Journal of Infectious Diseases, 128. Supplt. (July 1973)

33 - MAC LENMAN A.P.

Specific lipipolysaccharide of Bordetella
Biochemistry, 74. 398 (1960)

34 - MONTREUIL J., MONSIGNY M. et BUCHET M.T.

Etudes sur les glycoprotéines. Action alcalis sur les O-séryl et O-Threonyl β Nacétyl D glucosaminides. Mecanisme de la β élimination.
Compt. Rend ; Acad. Sci. Ser. D, 264. 2068-2071 (1967)

35 - MORRISON G.R.

Microchemical Determination of Organic Nitrogen with Nessler Reagent.
Analytical Biochemistry, 43. 527-532 (1971)

36 - NOWOTNY A.

Am. Chem. Soc. 83. 501 (1961)

37 - NOWOTNY A., KAZAI.N.

The use of mutants for the study of the relation ship between structure and function in endotoxins.
Colloques Internationaux du C.N.R.S. n° 174 (1967)

38 - RIETSCHEL E. Th., GOTTERT H., LUDERITZ O. et WESTPHAL O.

Nature and linkages of the fatty acids present in the Lipid-A component of Salmonella lipopolysaccharides.
Eur. J. Biochem. 28. 166-173 (1972)

39 - RONDLE and MORGAN Procedure

Biochem. J., 61. 586 (1955)

40 - SCHRAMM G., WESTPHAL O. et LUDERITZ O.

Bacterial irritants III Physicochemaical properties of a highy purified coli pyrogen.
Z. Naturforsh. 76. 594-598 (1952)

41 - SHAND J.W. et GRAHAM J.A.
Morphologic structure and biological activity of bacterial lipopolysaccharides.
Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 174 26-33 (1967)

42 - SHILO M. et WOMAN B.

Activities of bacterial levans an of lipopolysaccharides in the processes of inflamation and infection.
Brit. J. Explt. Pathol., 39. 652-660 (1958)

43 - SNYDER F. et STEPHENS N.

A simplified spectrophotometric determination of ester group in Lipid.

Biochem. Biophys. Acta., 34. 244-245 (1959)

44 - SOMOGYI M.

Notes on sugar determination.
J. Biol. Chem., 195. 19-23 (1952)

45 - STAUB A.M. et WESTPHAL O.

Etude chimique et biochimique de la spécificité immunologique des polyosides bactériens.
Bulletin de la société de Chimie Biologique. Tome XLVI n° 12 (1964)

46 - STONE S.H.

Mecanismes de l'exaltation de l'antigénicité par les adjuvants.
In HALPERN B. l'antigénicité.
Edition médicales de Flammarion, 86-95 (1963)

47 - TANAKA K., BERTOLINI M. et PIGMAN W.

Serine and threonine glycosidic linkage in bovine submaxillary mucin.
Biochem. Biophysic. Res. Commun. 16. 404-409 (1964)

48 - TREVELYAN W.E., PROCTER D.P. et HARRISON J.S.

Detection of Sugars on Paper Chromatograms
Nature, 166. 444-445 (1950)

49 - WEISSBACH H.A. et HURWITZ J.

The formation of 2-keto-3-désoxy heptonic Acid in Extracts of Escherichia-coli
J. Biol. Chem., 234. 707-709 (1959)

50 - WESTPHAL O., LUDERITZ O., BISTER F.

Uber die extraction von Bacterien mit Phenol-Wasser.
Z. Naturforsch. 7b. 148-155 (1952)

51 - WESTPHAL O.

Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à gram négatif.
Ann. Inst. Pasteur, 9 n°6. 789-813 (1960)

52 - WESTPHAL O., GMEINER J., LUDERITZ O., TANAKA A. et EICHENBERGER E.

Chemistry and biology of the Lipid-A component of enterobacterial lipopolysaccharides.
Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 174 70-77 (1967)

53 - WITBY J.L., MICHAEL J.G., WOODS M.W. et LANDY M.

Possible mecanism whereby endotoxins evoke increased non specific resistance.
Bact. Rev., 25. 437-446 (1961)

54 - WOBER W. et ALAUPOVIC P.

Studies on the protein moiety of endotoxine from gram-negativ bacteria. Characterisation of the protein moiety isolated by phenol treatement of endotoxin from Serratia marcescens 08 and Escherichia coli 0141-K85 (B).
Eur. J. Biochem. 19. 340-356 (1971)

55 - WOBER W. et ALAUPOVIC P.

Studies on the protein moiety of endotoxin from gram-negativ bacteria. Characterisation of the protein moiety isolated by acetic acid hydrolysis of endotoxin from Serratia marcescens 08.
Eur. J. Biochem. 19. 357-367 (1971)